

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Biochemie



Bc. Vojtěch Kaplan

*Nové analogy lidského insulinu s kovalentně stabilizovanými cyklickými strukturami
v C-konci B-řetězce*

*New analogues of human insulin with covalently stabilized cyclic structures
in the C-terminus of the B-chain*

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce / Školitel:

RNDr. Jiří Jiráček, CSc.

Prof. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha 2011

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci zpracoval samostatně pod vedením školitelů RNDr. Jiřího Jiráčka, CSc. a Prof Marie Stiborové, DrSc. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze, dne:

Podpis:

Abstract

Diabetes mellitus is considered as one of world's most common metabolic diseases. Complicated treatment and increasing number of newly diagnosed patients, suffering from diabetes every year, shows the importance and necessity of research in this area. Some of the major aims of this research are the development of new therapeutically utilized drugs and defining the problems of insulin acting in human body.

Insulin is a peptide hormone whose main physiological function is to regulate blood glucose level in organism connected with large impact on whole metabolism. Insulin acts through binding of its monomeric form to the insulin receptor. Upon binding to the receptor molecule of insulin undergoes specific structural changes, which put the hormone into an active state. As of now, the structure of the insulin's active monomeric form is still unknown. By testing binding affinities of many modified insulin analogues there was discovered strong evidence between structural conformation of the C-terminus of the B-chain and binding affinity to the receptor. The most crucial data, necessary for this work, were observed from the structure of highly active insulin analogues that possessed unique B²⁶ turn, recently prepared and described by team of Dr. J. Jiráček, IOCB AS CR.

The aim of this work was synthesis of three new insulin analogues with stabilized hypothetical active conformation by the covalent linkage in the C-terminus of the B-chain using the triazole bridge. We successfully prepared insulin analogues (marked by numbers: **12**, **13** and **14**) with following structures: analogue **12**-cyclo[G-(D-Prg^{B24})-F-Y-T-P-(D-K_{N3}^{B29})-T]-insulin, analogue **13**-cyclo[G-(D-K_{N3}^{B24})-F-Y-T-P-(D-Prg^{B29})-T]-insulin and analogue **14**-cyclo[G-G-F-Y-(L-Pent_{N3}^{B27})-P-(L-Prg^{B29})-T]-insulin, where K_{N3} represents the N^ε-azidolysine, Prg - propargylglycine and Pent_{N3} - 5-azido-2-pentanoic acid. Then we tested their binding affinities to the insulin receptor *in vitro*. Analogues **12** and **13** showed very low binding affinities to the receptor: 0,17% - analog **12** and 0,29 % - analog **13**, whereas human insulin affinity is 100%. On the other hand, the affinity of the third analog **14** was more than twice higher (206%) than the affinity of human insulin to the receptor (100%). This promising result shows that the structure of insulin analog **14** could be very similar to the conformation of the active state of hormone. More important structural details of the active insulin analog **14** should soon be available by the crystallographic study conducted by the team of Dr. A. M. Brzozowski (University of York, UK). „(In Czech)”

Abstrakt

Diabetes mellitus patří mezi celosvětově hojně rozšířená metabolická onemocnění. Komplikovaná léčba a rok od roku narůstající počty lidí trpících diabetem ukazují na nezbytnost výzkumu v této oblasti, mezi jehož primární cíle patří zejména vývoj nových terapeuticky účinných léčiv a objasnění problematiky působení hormonu insulinu v těle. Insulin je peptidový hormon, mezi jehož hlavní funkce patří regulace hladiny krevní glukózy spojená s širokým dopadem na celý metabolismus. Účinek insulinu je zprostředkován insulinovým receptorem, na který se hormon váže ve své monomerní formě. Po vazbě insulinu na jeho receptor dochází v jeho molekule ke specifickým strukturním změnám, které vedou ke vzniku tzv. aktivní formy hormonu. Struktura této aktivní monomerické formy insulinu není v současné době známa. Studium vazebné afinity řady insulinových analogů byla zjištěna důležitá úloha C-konce B-řetězce v molekule insulinu při jeho vazbě na receptor a následné aktivaci. Důležité strukturní informace, nezbytné pro vytvoření této práce, pak zejména přineslo studium struktury některých vysoce aktivních analogů insulinu s charakteristickým B²⁶-ohybem připravených v laboratoři Dr. J. Jiráčka ÚOCHB AV ČR.

Cílem této práce byla příprava 3 nových insulinových analogů, které by hypotetickou aktivní konformaci hormonu stabilizovaly pomocí cyklické kovalentní struktury vytvořené v C-konci B-řetězce přemostěním triazolovým můstkem. Úspěšně byly připraveny insulinové analogy (v práci uváděny pod čísla **12**, **13** a **14**) s následujícími strukturami: analog **12** - cyklo[G-(D-Prg^{B24})-F-Y-T-P-(D-K_{N3}^{B29})-T]-insulin, analog **13** - cyklo[G-(D-K_{N3}^{B24})-F-Y-T-P-(D-Prg^{B29})-T]-insulin a analog **14** - cyklo[G-G-F-Y-(L-Pent_{N3}^{B27})-P-(L-Prg^{B29})-T]-insulin, kde K_{N3} značí N^ε-azidolysin, Prg - propargylglycin a Pent_{N3} - 5-azido-2-pentanovou kyselinu. Následně byla testována jejich vazebná afinita k insulinovému receptoru *in vitro*. Analogy **12** a **13** vykazovaly pouze slabou afinitu: 0,17% - analog **12** a 0,29 % - analog **13**, oproti lidskému insulinu (100%). Třetí analog **14** naopak vykazoval silnou, více než dvojnásobnou afinitu k receptoru (206%) oproti lidskému insulinu (100%). Tento slibný výsledek ukazuje, že struktura námi připraveného analogu **14** by mohla být velice podobná konformaci aktivní formy hormonu insulinu. Detailní prozkoumání konformace molekuly tohoto analogu také přinese v blízké době krystalografická studie ve spolupráci s laboratoří Dr. A. M. Brzozowského (University of York, Velká Británie).

Poděkování

V první řadě bych chtěl tímto poděkovat svému školiteli-specialistovi RNDr. Jiřímu Jiráčkovi, CSc. za odborné vedení a všestrannou pomoc při tvorbě této práce a Prof. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za laskavost a vstřícnost. Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Emílii Kletvíkové za cenné rady a pomoc v experimentální části práce a také celému kolektivu skupiny Dr. Jiráčka ÚOCHB AV ČR za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Obsah

Abstract.....	2
Abstrakt.....	3
Poděkování.....	4
Obsah	5
Seznam použitých zkratk	7
Úvod.....	9
Insulin.....	9
Struktura a funkce insulinu.....	9
Insulinový receptor	10
Účinky insulinu	11
Glukózové přenašeče (GluT).....	11
Regulace sekrece insulinu	12
Diabetes mellitus.....	13
Diabetes mellitus typu 1	13
Diabetes mellitus typu 2	13
Ostatní typy diabetu.....	14
Projevy diabetu	14
Akutní komplikace diabetu	14
Pozdní komplikace diabetu	15
Léčba diabetu.....	16
Perorální a jiná antidiabetika	16
Léčba insulinem.....	16
Insulinové analogy	17
Analogy s rychlým nástupem účinku	18
Analogy s prodlouženým účinkem.....	19
Struktura a biologická aktivita	21
C-konec B-řetězce molekuly insulinu	21
Zkrácené analogy insulinu s modifikacemi v C-konci B-řetězce.....	22
Nezkrácené insulinové analogy se strukturou B ²⁶ ohybu.....	23

Rozdíly ve vazebných afinitách analogů s B ²⁶ ohybem	24
Nové analogy insulinu s cyklickými strukturami v C-konci B-řetězce.....	25
Cíl práce	27
Metody	28
Použité chemikálie a materiály	28
Použité přístroje	28
Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenou fází (RP-HPLC)	29
Syntéza lineárních oktapeptidů	29
Cyklizace oktapeptidů	31
Enzymová semisyntéza insulinových analogů	31
Hmotnostní spektrometrie	32
Testování vazebných afinit insulinových analogů <i>in vitro</i>	32
Výsledky	34
Syntéza lineárních oktapeptidů	34
Cyklizace oktapeptidů	35
Enzymová semisyntéza insulinových analogů	37
Testování vazebné afinity insulinových analogů <i>in vitro</i>	44
Diskuze	45
Závěr	49
Seznam použité literatury	50

Seznam použitých zkratk

ACN - acetonitril
ATP - adenosintrifosfát
ADP - adenosindifosfát
BSA - hovězí sérový albumin
DCM - dichloromethan
DIC - dicyklohexylkarbodiimid
DIPEA - N,N-diisopropylethylamin
DMF - N,N-dimethylformamid
DOI - des (B²³-B³⁰) oktapeptid insulin
DPP-4 - dipeptidyl peptidáza 4
DTI-NH₂ - des (B²⁷-B³⁰) tetrapeptid B²⁶-amid insulin
EDTA - kyselinu ethylendiamintetraoctová
ESI - electrospray ionization
Fmoc - 9-fluorenylmethoxykarbonyl
GLP-1 - glucagon like peptide 1
HBTU - 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorofosfát
HEPES - 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinylethanesulfonová kyselina
HLA - human leukocyte antigen
HOBT - N-hydroxybenzotriazolu
IDDM - insulin dependentní diabetes mellitus
IR - insulinový receptor
K_{N3} - N^ε-azidolysin
MeOH - methanol
MODY - maturity onset diabetes of the young
NIDDM - non-insulin dependentní diabetes mellitus
NMP - N-methyl-2-pyrrolidon
NPH - neutral protamine hagedorn
PAD - perorální antidiabetika

Pent_{N3} - (S)-5-azido-2-pentanová kyselina

Prg - propargylglycin

RP-HPLC - reverse phase-high pressure liquid chromatography

SPPS - solid phase peptide synthesis

tBu - *tert*-butyl

TFA - trifluoroctová kyselina

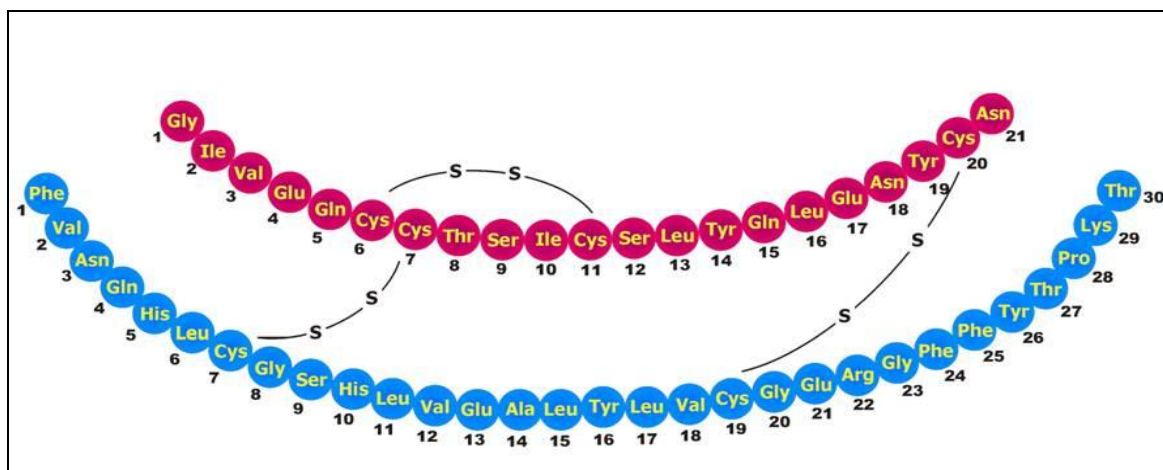
TFE - 2, 2, 2-trifluorethanol

TIS - triisopropylsilan

Úvod

Insulin

Insulin je peptid či malý protein složený z 51 aminokyselin uspořádaných do dvou řetězců A a B, které jsou k sobě spojeny dvěma disulfidickými můstky. Třetí disulfidický můstek je přítomen v řetězci A (Obrázek 1). Insulin je jeden z centrálních hormonů organismu, mezi jehož hlavní funkce patří zprostředkování vstupu glukózy z krve do jater, svalů a tukové tkáně, její ukládání ve formě glykogenu a zpracování na energii.



Obrázek 1. Primární struktura molekuly lidského insulinu s červeně vyznačeným řetězcem A a modře vyznačeným řetězcem B.

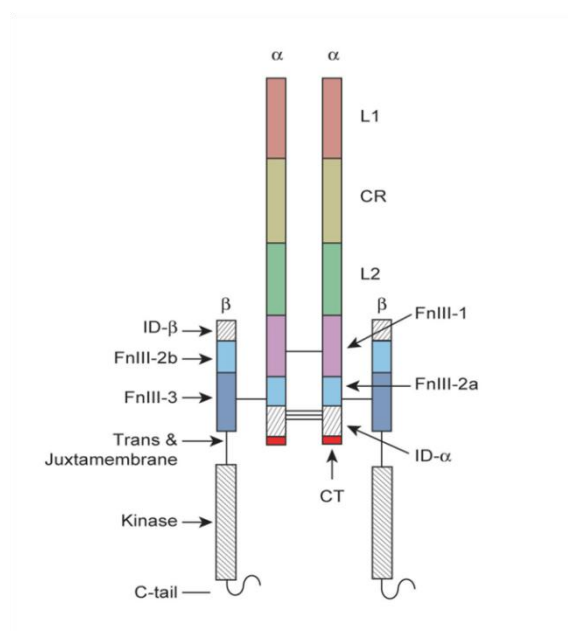
Struktura a funkce insulinu

Produkce insulinu v lidském těle je lokalizována v Langerhansových ostrůvcích pankreatu (1). Ty tvoří necelé 2% celkového objemu slinivky a jsou tvořeny 4 typy buněk lišícími se svou hormonální produkcí. Insulin vzniká v tzv. B (β) - buňkách, které vyplňují vnitřek Langerhansových ostrůvků a zabírají přibližně 60% celkového počtu buněk. Mezi další typy buněk pankreatu jsou řazeny: A (α) - buňky produkující glukagon, D (δ) - buňky zajišťující produkci růstového hormonu somatostatinu a tzv. F - buňky, které jsou místem tvorby pankreatického polypeptidu. Při vlastní biosyntéze insulinu je prvotním translačním produktem insulinového genu tzv. preproinsulin. Po odštěpení signální sekvence o délce

23 aminokyselin vzniká proinsulin. Molekula lidského proinsulinu obsahuje 81 aminokyselin uspořádaných v jednom řetězci, který je fixován dvěma disulfidickými můstky. Proinsulin je skladován v sekrečních granulích Golgiho aparátu, kde vytváří rozpustné hexamery koordinované okolo zinečnatých iontů. V granulích dále dochází k jeho enzymovému štěpení specifickými konvertázami na insulin a vyštěpení tzv. C - peptidu. Mechanismem exocytosis je poté insulin uvolňován do krevního řečiště. Lidský insulin je v sekrečních granulích přítomen v krystalické formě s hexamerním uspořádáním. Po přechodu do krve je ale vlivem změny pH z 5,5 na 7,4 tento koordinovaný stav narušen a dochází k rozpadu krystalů na dimer a posléze na monomer insulinu (2).

Insulinový receptor

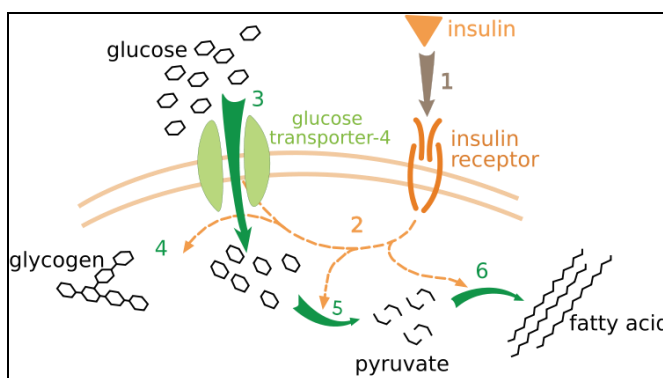
Účinek insulinu je zprostředkován insulinovým receptorem. Je to transmembranový proteinový tetramer, skládající se z 1380 aminokyselin uspořádaných do dvou α a β podjednotek (Obrázek 2). Zatímco α podjednotková část zodpovídá za vazbu insulinu k receptoru, jeho β podjednotky s tyrosin-kinázovou aktivitou přenáší vazebný signál insulinu pomocí fosforylační kaskády dále do buňky. Díky této vlastnosti je také insulinový receptor řazen do třídy receptorů s tyrosin-kinázovou aktivitou. Ačkoli struktura insulinového receptoru je dnes již relativně dobře prozkoumána (3), ve stavu s navázaným insulinem se tento komplex zatím nepodařilo připravit v krystalické formě a plně tak objasnit, k jakým konformačním změnám po navázání insulinu v tomto komplexu dochází a jak se insulin na receptor váže (4).



Obrázek 2. Schématická struktura insulinového receptoru $\alpha_2\beta_2$ s jeho označenými částmi: L1, L2 - homologní domény s vysokým obsahem leucinu; CR - doména s vysokým obsahem cysteinu, FnIII - fibronectinové domény, ID β - vložená doména β - podjednotky, ID α - vložená doména α - podjednotky, CT - doména karboxylového konce. (4)

Účinky insulinu

Hlavním biologickým účinkem insulinu je snižování koncentrace glukózy v krvi a podpora jejího transportu do buněk (2) (Obrázek 3). Insulin působí prakticky na všechny buňky těla s výjimkou mozku a srdce, které jsou glukózou zásobeny nezávisle na insulinu. V játrech, svalové a tukové tkáni dále stimuluje tvorbu glykogenu, zpomaluje jeho odbourávání a podporuje glykolýzu. V případě glykolýzy aktivuje některé enzymy (hexokináza, fosfofruktokináza a fosfoenolpyruvát kináza). Při syntéze glykogenu inhibuje insulin fosforylaci jaterní glykogen-syntetázy a tím ji aktivuje. Mezi další fyziologické účinky insulinu patří také ovlivnění procesu glukoneogeneze, kde inhibuje klíčový enzym fosfoenolpyruvát karboxykinázu.



Obrázek 3. Vazba insulinu na receptor (1) indukuje aktivační kaskádu (2), která vyústí v translokaci přenašeče Glut-4 a vstupu glukózy do buňky (3), v syntézu glykogenu (4), glykolýzu (5) a syntézu mastných kyselin (6). (<http://en.wikipedia.org/>)

Glukózové přenašeče (GluT)

Glukózové přenašeče (GluT) zprostředkovávají vstup glukózy do buněk (5). Jsou to membránové proteiny, obsahující zpravidla 12 α helikálních struktur překračující buněčnou membránu. Jejich počet v membráně je ovlivňován právě insulinem. Jestliže insulin nepůsobí, jsou přenašeče přítomny v cytosolu jako součásti endozomů. Insulin přes sérii kroků fosforylační kaskády, zahrnující aktivaci některých proteinkinas a fosforylaci specifických bílkovin, aktivuje tyto endozomy, které se následně zapojují do buněčné membrány a plní svojí transportní funkci. Celkem bylo charakterizováno 12 typů těchto přenašečů (GluT1-GluT12). Zásadní význam mají především přenašeče tzv. 1. třídy:

GluT1-GluT4. Přenašeče GluT1 a GluT3 se vyskytují v cévách zásobujících mozek a v neuronech. Jejich funkce je na insulinu nezávislá. Ve svalech, srdci a tukové tkáni plní funkci transportu glukózy insulinem aktivované přenašeče GluT4. Přenašeče GluT2 jsou přítomny v β -buňkách, kde plní především autoregulační funkci.

Regulace sekrece insulinu

Sekrece insulinu β -buňkami Langerhansových ostrůvků je primárně regulována koncentrací glukózy v krvi (2). Její normální hodnota v krvi se pohybuje v rozmezí 3,5-5,5 mmol.l⁻¹. Celý proces sekrece insulinu je poměrně složitý a zahrnuje několik na sebe navazujících dějů. Primárním impulsem je však koncentrace resp. poměr ATP/ADP uvnitř β -buněk. Zvýšení koncentrace glukózy vyvolá zvýšení koncentrace ATP a tím zvýšení poměru ATP/ADP. Následně dojde k uzavření ATP-senzitivních K⁺ kanálů což vyvolá změnu membránového potenciálu, která způsobí otevření Ca²⁺ kanálů a vstup vápenatých iontů do buněk. Ty působí jako druhý posel a aktivují řadu proteinkináz. V konečném důsledku se pak sledem kontrakcí mikrofilamentového a mikrotubulárního buněčného aparátu přemísťují sekreční granule insulinu k místu exocytózy na buněčné membráně.

Diabetes mellitus

Diabetes mellitus neboli cukrovka je onemocnění způsobené poruchou v produkci a působení hormonu insulinu. Odhaduje se, že v roce 2010 bylo na světě asi 285 milionů diabetiků a že v roce 2030 jich může být až 438 milionů. Diabetes je klasifikován do několika typů, lišících se příčinou a průběhem onemocnění (6).

Diabetes mellitus typu 1

Diabetes mellitus typu 1 bývá označován jako tzv. „insulin dependentní diabetes mellitus“ (IDDM) (6). Je způsoben autoimunitní destrukcí β -buněk Langerhansových ostrůvků. Organismus diabetika je tedy plně závislý na dodání insulinu umělou formou. Ve většině případů dochází k první manifestaci onemocnění mezi 10 a 15 lety života. Proto bývá tento typ diabetu někdy též označován jako tzv. „juvenilní“ diabetes. Onemocnět mohou však i starší lidé. Uvažuje se, že možnou příčinou nastartování autoimunitní reakce postiženého může být prodělání virového onemocnění. IDDM je označován, jako tzv. multifaktoriálně dědičné onemocnění tzn., že na jeho vzniku se podílí soubor genetických i negenetických faktorů. Byly sice prokázány vazby na určité HLA genotypy, avšak v současné době neexistuje přesné stanovení genu či souboru genů, které pravděpodobnost vzniku diabetu typu 1 s přesností určí.

Diabetes mellitus typu 2

Diabetes mellitus typu 2 bývá zpravidla nazýván jako tzv. „non-insulin dependentní diabetes mellitus“ (NIDDM) neboli diabetes mellitus nezávislý na insulinu (6). Do této skupiny patří 90% diabetiků. Mezi hlavní projev onemocnění patří insulinová rezistence, tj. snížená citlivost buněk vůči insulinu. Tu může způsobovat v první řadě snížení počtu insulinových receptorů nebo blokáda vnitrobuněčné signalizační kaskády. Produkce insulinu β -buněk pankreatu diabetika typu 2 tak zůstává zachována, avšak bez schopnosti účinně zprostředkovávat transport glukózy do buněk. Diabetes typu 2 bývá řazen mezi civilizační choroby, které jsou silně ovlivněny životním stylem

postiženého. Manifestován bývá zpravidla ve vyšším věku a mezi hlavní faktory, podílející se na jeho vzniku, patří bezesporu obezita. Ačkoli jsou známy některé konkrétní mutace genů schopných silně ovlivňovat predispozice k tomuto onemocnění (insulin, insulinový receptor či glykolytické enzymy), komplexnost diabetu typu 2 jakoukoli přesnější diagnózu tohoto typu značně ztěžuje. Výjimku tvoří určitá skupina nemocných s výskytem tzv. monogenního diabetu, tj. diabetu způsobeného mutací jednoho či více konkrétních genů. Průběh tohoto onemocnění se však značně odlišuje od diabetu typu 1 a 2 a bývá klasifikován samostatně většinou jako tzv. MODY (7).

Ostatní typy diabetu

V průběhu těhotenství se u žen může vyskytnout tzv. těhotenský neboli gestační diabetes (8). Jeho trvání je dočasné, redukovatelné úpravou stravy a zpravidla končí brzy po porodu. V současné době tento typ diabetu nepředstavuje žádná velká rizika jak pro plod i matku. Celá řada onemocnění, která souvisí s poruchou funkce pankreatu, může vyvolat tzv. sekundární diabetes (9). Patří mezi ně zejména chronické záněty slinivky, nádorová onemocnění spojená s velkým chirurgickým zákrokem či hematochromatóza.

Projevy diabetu

Diabetes mellitus je závažné metabolické onemocnění, které svým dopadem ovlivňuje širokou paletu fyziologických dějů organismu. Komplikace způsobené tímto onemocněním vycházejí ze základního fyziologického projevu diabetu - zvýšené hladiny koncentrace glukózy v krvi a jejího nedostatku v buňkách. Můžeme je rozdělit na akutní a pozdní komplikace (10).

Akutní komplikace diabetu

Hlavními projevy akutních komplikací diabetu jsou hyper- a hypo- glykémie (10). Hyperglykemický stav je charakterizován vysokými hodnotami koncentrace glukózy v plazmě odebrané na lačno, přesahujícími 7 mmol.l^{-1} , při náhodném odběru pak zpravidla i okolo 11 mmol.l^{-1} . Mezi nejčastější projevy tohoto stavu patří žízeň, časté a vydatné močení, únava až poruchy vědomí. Při hyperglykemickém stavu hrozí postiženému vznik

diabetické ketoacidózy, kdy nedostatek energie v buňkách spouští lipolýzou následnou tvorbu ketolátů, které se hromadí v krvi a snižují její pH.

Hypoglykémie vzniká u diabetika nejčastěji díky nepoměru mezi dávkou podaného insulínu a jeho skutečnou potřebou. Může se tak stát při podání vyšší dávky insulínu či vynechání příjmu potravy. V reakci na hypoglykémii tělo vyplavuje adrenalin a jsou přítomny charakteristické příznaky jako pocení, zvýšení srdeční činnosti apod. Díky nedostatku glukózy pro energetické zásobení mozku hrozí poruchy vědomí až kóma.

Pozdní komplikace diabetu

Pozdní komplikace diabetu vznikají v důsledku déletrvajícího hyperglykemického stavu (11). Vysoká koncentrace glukózy v krvi způsobuje glykaci krevních bílkovin, bílkovin stěn krevních cév a změny jejich přirozené fyziologické funkce. Dále podporuje vznik oxidačního stresu organismu, mezi jehož nejčtenější projevy spadá např. cévní ateroskleróza. Mezi nejčastější projevy pozdních komplikací diabetu tak patří poškození různých druhů cév (diabetická nefropatie, retinopatie a makroangiopatie) a nervů (diabetická neuropatie). Rozvinutá diabetická neuropatie dolních končetin kombinovaná s poškozením cév či infekcí může u diabetika vyústit v tzv. syndrom diabetické nohy (Obrázek 4). V neléčeném případě může toto postižení končit až gangrénou a následnou amputací dolní končetiny.



Obrázek 4. Diabetická noha (www.wikipedia.cz)

Léčba diabetu

Diabetes mellitus patří mezi velmi obtížně léčitelná onemocnění (11). Komplexní řešení nabízí pouze transplantace celého pankreatu, Langerhansových ostrůvků či β -buněk. K transplantaci se nejčastěji přistupuje u diabetiků typu 1. U diabetu typu 2 ji zpravidla podstupují starší pacienti spolu s transplantací ledvin postižených diabetickou nefropatií. Vzhledem k rozšíření onemocnění a náročnosti samotného zákroku však nemá tento způsob léčby globální uplatnění. Primárním cílem léčby diabetu je snaha o udržení fyziologické hodnoty koncentrace glukózy v krvi (3,5-5,5 mM). Zahrnuje především dodržování správného složení potravy a s tím spojené diety (u diabetu typu 2), dostatečnou fyzickou aktivitu a vhodnou farmakoterapii.

Perorální a jiná antidiabetika

Perorální antidiabetika (PAD) se využívají pouze pro léčbu diabetu typu 2 (11). Veskrze se jedná o látky buď zvyšující citlivost buněk k insulinu - tzv. senzitizerů (metformin či pioglitazon) nebo látky zvyšující sekreci insulinu β -buňkami tzv. sekretagoga (glipizid, glipemirid či repaglinid). Jako PAD jsou také využívány některé inhibitory střevních glukosidáz, zpomalující vstřebávání glukózy ve střevech (miglitol či akarbóza). Z dalších používaných antidiabetik je třeba zmínit analogy glukagon-like peptidu 1 (exenatide či liraglutide), které účinně zvyšují sekreci insulinu za současné inhibice tvorby glukagonu. Tyto analogy jsou podávány převážně subkutánní formou (nepatří již tedy do zmiňované skupiny perorálních antidiabetik) často v kombinaci s inhibitory dipeptidyl peptidázy 4 (DPP-4) což jsou tzv. gliptiny, jako např. sitagliptin či vildagliptin. Účinnost gliptinových antidiabetik spočívá v prodloužení biologického poločasu GLP-1, který je za normálních okolností rychle odbouráván enzymem DPP-4.

Léčba insulinem

Léčba insulinem je majoritně využívána při terapii diabetu typu 1. Dnes se již prakticky ve všech případech používá rekombinantně připravený lidský insulin z bakteriálních kultur *Escherichia coli* či kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* (11). Insulin je nutné podávat

subkutánní formou, nejčastěji pomocí tzv. insulinových per (Obrázek 5), injekční stříkačky či insulinové pumpy spojené s glukometrem (Obrázek 6) (12). Léčba pomocí lidského insulinu s sebou nese řadu problémů a rizik, mezi které patří zejména výběr správné dávky a její načasování tak, aby v dané chvíli dávka přesně odrážela fyziologickou potřebu organismu. V neposlední řadě je pak pro pacienty nepříjemný samotný invazivní způsob podání insulinu. Forma podání insulinu má zásadní vliv na rychlost jeho distribuce v organismu a jeho biologickou odpověď. Biologický poločas insulinu v těle je velmi krátký (4-6 minut) z důvodu co nejcitlivější regulace koncentrace glukózy v těle. Pro farmakoterapii diabetu lidským insulinem je však tato vlastnost insulinu velmi nepraktická. Byly proto vyvinuty insulinové preparáty, u kterých je biologický poločas zvýšen. Příkladem může být tzv. NPH insulin - „neutral protamine hagedorn“ (komerčně prodáván pod názvy Humulin N či Novolin N). V této formě je subkutánně podávána suspenze krystalického lidského insulinu a bazického peptidu protaminu, která se vstřebává z podkoží do krve pomaleji než čistý krystalický insulin a prodlužuje tak jeho biologický poločas v těle. Další možností je podání roztoku insulinu o pH 4, kdy je insulin zcela rozpustný. Po subkutánní aplikaci do těla (pH 7,4) pak insulin precipituje a pomalu se uvolňuje do organismu.



Obrázek 5. Insulinová pera Novolin-pen4
(www.novonordisk.ca)



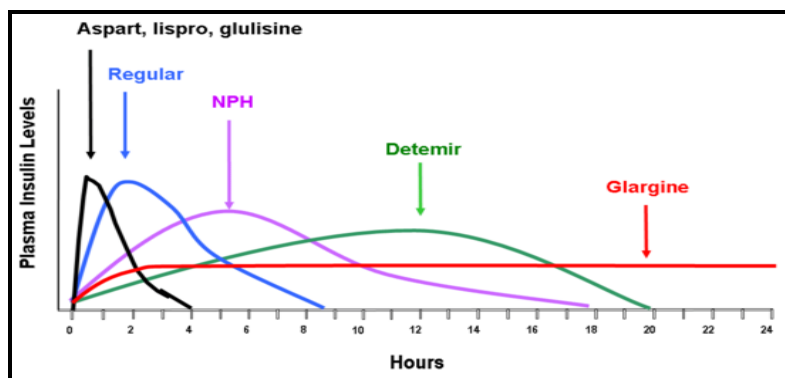
Obrázek 6. Insulinová pumpa s glukometrem
(www.diabetesaja.cz)

Insulinové analogy

Analogy insulinu jsou vyvíjeny především z důvodu zlepšení kvality léčby diabetu a zvýšení komfortu pacientů (13). Dalším důležitým důvodem přípravy analogů insulinu je zkoumání interakce insulinu s receptorem insulin (14), neboť jak již bylo výše zmíněno, doposud není interakce těchto dvou proteinů dopodrobna prozkoumána a krystalový komplex obou molekul nebyl doposud připraven.

Analogy insulínu jsou látky, které vycházejí svojí strukturou ze struktury molekuly lidského insulínu, avšak cílenými modifikacemi v aminokyselinové sekvenci A či B řetězce je u nich docíleno pozměněných biologických účinků a rozdílné vazebné afinity vůči receptoru.

V současné době je na trhu celkem 5 preparátů těchto analogů využívaných v lékařské praxi (15). Tři z nich jsou tzv. rychle působící insulinové analogy (Lispro, Aspart a Glulisine). Vyznačují se rychlejším nástupem a rychlejším odezněním účinku vzhledem k lidskému insulínu (Obrázek 7). Zbylé dva analogy (Glargine a Detemir) patří mezi tzv. dlouhodobě působící analogy a vyznačují se několikanásobně prodlouženou dobu účinku (Obrázek 7).



Obrázek 7. Plazmatické koncentrace insulínu a jeho klinicky používaných analogů v čase od jejich podání. (<http://www.medscape.org/viewarticle/582999>)

Principem vlastností těchto klinicky používaných analogů je změna jejich rozpustnosti vzhledem k přirozenému insulínu. Té je docíleno především ovlivněním schopnosti dimerizace a tvorby hexamerů, změnou pI molekul analogů či zvýšení schopnosti jejich vazby na sérové proteiny.

Analogy s rychlým nástupem účinku

Všechny tři klinicky používané analogy (Lispro, Aspart a Glulisine) byly připraveny modifikacemi aminokyselin v primární struktuře molekuly lidského insulínu za účelem snížení schopnosti dimerizace molekuly a tím zvýšení rozpustnosti dané látky, vedoucí ke zrychlenému vstřebávání (16). Hlavním výhodou při aplikaci těchto látek je tak rychlejší snížení koncentrace glukózy v krvi při hyperglykemických stavech než při podání

klasického lidského insulínu a zároveň umožňují pacientům dřívější příjem potravy po aplikaci analogu než při podání lidského insulínu.

Insulin Lispro (Obrázek 8A) byl první vyvinutý analog s rychlým nástupem účinku (17). Byl připraven záměnou aminokyselin lysinu a prolinu v pozicích 28 a 29 B-řetězce, což vede k výrazně snížené schopnosti analogu tvořit dimery. Na trhu je dostupný od roku 1996 pod názvem Humalog (firma Eli Lilly).

Insulin Aspart (Obrázek 8B) byl připravený záměnou aminokyseliny prolinu v pozici 28 B-řetězce za kyselinu asparagovou (18). Byl schválen pro klinické použití v roce 2000 pod názvem Novalog (firma Novo Nordisk). Tento analog se opět vyznačuje sníženou schopností tvořit dimery.

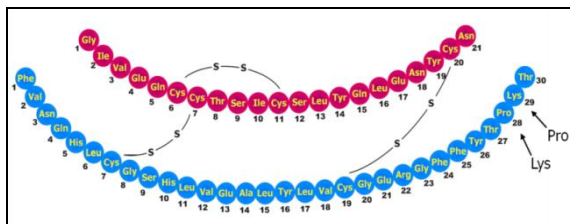
V molekule analogu Glulisine (Obrázek 8C) je v řetězci B substituovaná asparagová kyselina na pozici B³ lysinem a molekula lysinu na pozici B²⁹ kyselinou glutamovou (19). Insulin Glulisine je klinicky dostupný od roku 2004 pod názvem Apidra (firma Sanofi Aventis).

Analogy s prodlouženým účinkem

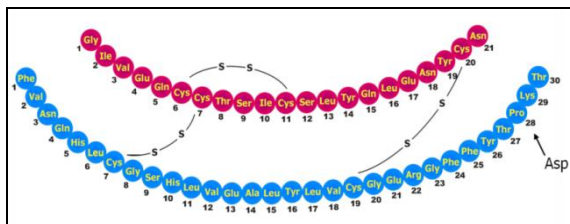
Glargine (Obrázek 8D) je analog insulínu s náhradou asparaginu glycinem v pozici 21 A-řetězce a přidáním dvěma molekulami argininu v pozici 30 B-řetězce (20). Je komerčně dostupný od roku 2003 pod názvem Lantus (firma Sanofi Aventis). V případě analogu Glarginu tak dochází ke zvýšení pI molekuly analogu. Po jeho subkutánní aplikaci pak k tvorbě precipitátů a pomalejšímu uvolňování do krve.

Molekula analogu Detemiru vykazuje díky přítomnosti hydrofobního postranního řetězce vyšší schopnosti tvorby hexamerů. To spolu s vyšší afinitou k plazmatickému albuminu přispívá k výslednému prodlouženému efektu této látky. Detemir (Obrázek 8E) byl připraven připojením kyseliny myristové na lysin pozici 29 B-řetězce (21). Je komerčně dostupným od roku 2006 pod názvem Levemir (firma Novo Nordisk).

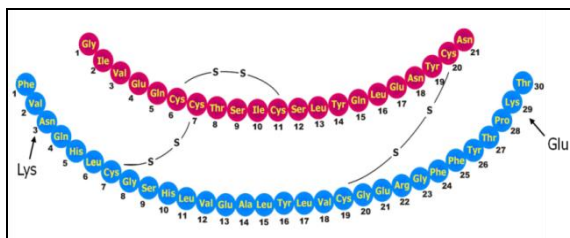
A



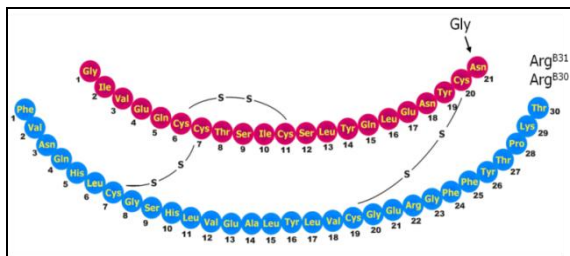
B



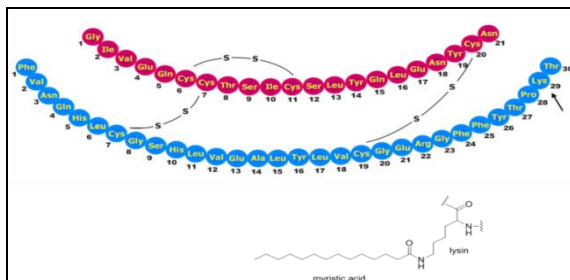
C



D



E



Obrázek 8. Primární struktury molekul insulinových analogů: A. Lispro, B. Aspart, C. Glulisine, D. Glargine a E. Detemir. Na jednotlivých obrázcích A-E jsou vyznačeny modifikace příslušných analogů vůči lidskému insulinu.

Struktura a biologická aktivita

Výsledný metabolický efekt insulinu je zprostředkován vazbou insulinu ve formě monomeru na insulinový receptor (IR) (4). Ačkoli struktura molekuly insulinu je již dobře prozkoumaná, mechanismus vazby hormonu na receptor není stále plně objasněn. Detailní analýze struktury komplexu brání především relativně nízká vazebná afinita molekuly insulinu vůči dostupným, purifikovaným, rekombinantním konstruktům receptoru insulinu. Dalším důvodem proč se krystalický komplex nedaří připravit a analyzovat můžou být i dynamické konformační změny ve struktuře obou molekul, receptoru i insulinu, při vzájemné interakci. Dnes se již zdá jisté, že dostupné krystalové struktury insulinu představují pouze zásobní a neaktivní formy hormonu, dimerní či hexamerní (14). Vazba monomeru insulinu na jeho receptor zcela jistě indukuje strukturní změny v molekule hormonu zahrnující odkrytí některých důležitých aminokyselin, které jsou v zásobní formě nepřístupné. Postupným studiem primární sekvence molekuly insulinu za současného sledování změn v afinitě modifikovaných sloučenin byly zjištěny strukturní elementy, které se nejvíce podílejí na interakci se samotným receptorem. Mezi ně patří aminokyseliny v následujících pozicích: Leu^{B11}, Val^{B12}, Leu^{B15}, Gly^{B23}, Phe^{B24}, Phe^{B25} a Tyr^{B26} v řetězci B spolu s Gly^{A1}, Ile^{A2}, Val^{A3}, Gln^{A5}, Tyr^{A19} a Asn^{A21} ležícími v řetězci A (22). Jelikož některé jmenované oblasti A-řetězce (A¹-A³) jsou v zásobní formě molekuly stíněny sekvencí aminokyselin C-konce B-řetězce (B²⁵-B³⁰), byla vyslovena hypotéza, že pro úspěšné navázání insulinu na receptor musí v C-konci B-řetězce docházet k jistým prostorovým změnám, velmi pravděpodobně k ohybu řetězce, nezbytným pro odkrytí vazebných míst v řetězci A (14). Taková forma insulinu je nazývána tzv. aktivní formou či konformací insulinu.

C-konec B-řetězce molekuly insulinu

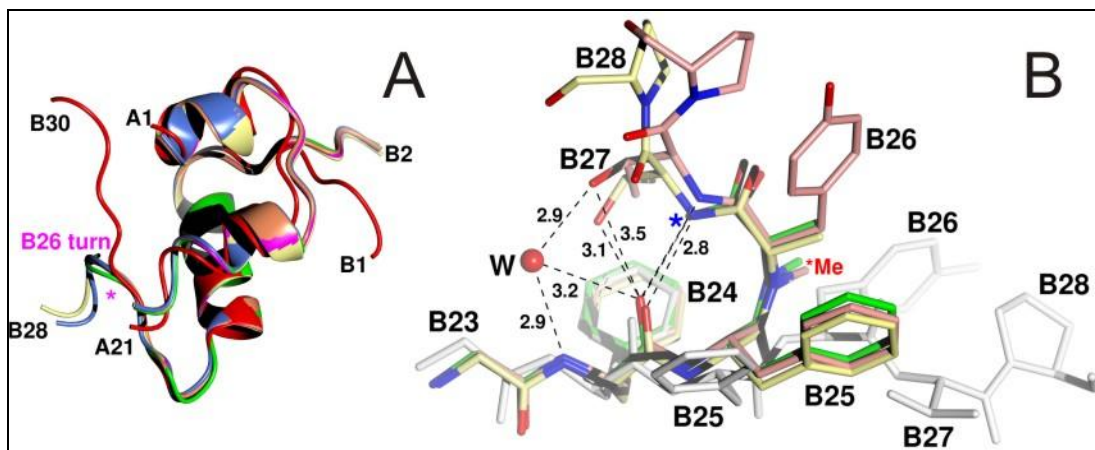
Důležitá úloha C-konce B-řetězce při interakci s insulinovým receptorem byla poprvé rozpoznána z naměřených hodnot nízké vazebné afinity des (B²³-B³⁰) oktapeptid insulinu (DOI) (23). Testováním řady analogů s pozměněnými aminokyselinami v této části molekuly insulinu byla zjištěna i velmi důležitá úloha C-konce B-řetězce pro tvorbu dimerů insulinu (24). Této vlastnosti C-konce B-řetězce bylo také využito při syntéze rychle působících insulinových analogů se záměnami aminokyselin v pozicích B²⁸ a B²⁹

(Lispro, Aspart a Glulisine - viz výše). Modifikací aminokyselin v pozici B²⁴ bylo připraveno několik analogů vykazující jak nízkou vazebnou afinitu k receptoru (v % relativně oproti nativnímu insulinu) jako např. Leu B²⁴ (12%) (25) a Ala B²⁴ (1%) (26), či s insulinu podobnou afinitou jako Ser B²⁴ (7%) (16) nebo Gly B²⁴ (100%) (27) rovněž i vysokou jako D-Ala B²⁴ (150%) (26) a D-Phe B²⁴ (140% až 180%) (16;26). Nahrazením fenylalaninu v pozici B²⁵ serinem, alaninem či leucinem vede k velkému snížení afinity molekuly - Ser B²⁵ (1%) (28), Ala B²⁵ (7%) (16) a Leu B²⁵ (1%) (29). Na druhou stranu při substituci aromatickým derivátem alaninu 1-naftylalaninem bylo pozorované snížení aktivity jen o 50% (30) a při substituci tyrosinem byla zachována plná vazebná afinita (103%) (31). Tento fakt ukazuje na vysokou konzervovanost pozice B²⁵ a nutnou přítomnost aromatické struktury v této pozici pro zachování biologické aktivity molekuly (14).

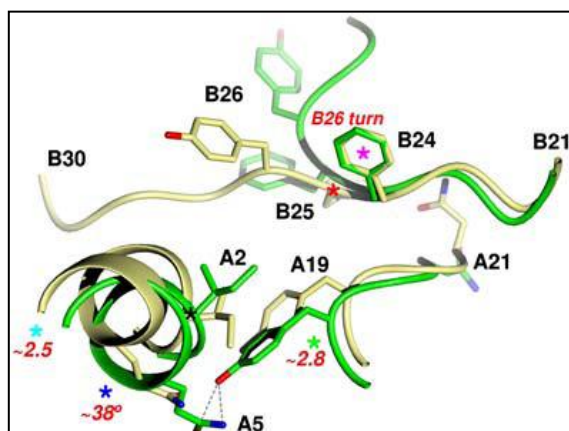
Zkrácené analogy insulinu s modifikacemi v C-konci B-řetězce

K objasnění úlohy C-konce B-řetězce insulinu, ve vztahu k jeho afinitě k receptoru, byly syntetizovány molekuly analogů insulinu s modifikacemi zahrnujícími delecí aminokyselin v pozicích B²⁷-B³⁰, záměnu aminokyseliny v pozici B²⁶ za N-methylovanou či D-aminokyselinu spolu s karboxyamidací C-konce v poloze B²⁶ (4;32;33). Výsledkem bylo objevení několika látek se značně zvýšenou afinitou k insulinovému receptoru z nichž po detailní krystalografické analýze přinesl cenné strukturní informace například zkrácený analog s N-methylovaným alaninem v pozici B²⁶, NMeAla^{B26}-DTI-NH₂. Tento analog vykazuje více než čtyřnásobně vyšší afinitu k insulinovému receptoru než samotný insulin a v jeho struktuře byly objeveny některé velmi zajímavé rysy. Ty zahrnují především nově vzniklý β -ohyb mezi Phe^{B24} a NMeAla^{B26} (tzv. B²⁶ ohyb) (Obrázek 9A) spojený se změnou konformace peptidové vazby mezi aminokyselinami v pozicích B²⁵-B²⁶ z trans na cis a stabilizací vzniklého B²⁶ ohybu vodíkovým můstkem mezi CO skupinou fenylalaninu v pozici B²⁴ a karboxyamidovou skupinou C-koncového alaninu v poloze B²⁶ (Obrázek 9B). V důsledku těchto změn dochází ve struktuře molekuly k odklopení části C-konce B-řetězce (B²⁵-B²⁶) a zpřístupnění jinak stíněných aminokyselin řetězce A (A¹-A³) pro interakci s receptorem. Tyto změny v konformaci C-koncové části B-řetězce jsou doprovázeny rotací N-terminální části řetězce A za současného vzniku vodíkového můstku mezi aminokyselinami Tyr^{A19} a Gln^{A5}, který v důsledku vede ke zvětšení styčné

plochy pro nepolární interakci s receptorem v této oblasti (Obrázek 10). Bylo navrženo, že struktury vysoce afinitních analogů obsahující B²⁶ ohyb mohou být velmi podobné tzv. aktivní formě či konformaci insulinu indukované při vazbě hormonu na receptor (4).



Obrázek 9. A. Základní struktura řetězců některých analogů insulinu s motivem B²⁶ ohybu („B26 turn“). Červeně - nativní lidský insulin, fialově - NMeAla^{B26}-DTI-NH₂, modře - NMeAla^{B26}-insulin, žlutě - NMeTyr^{B26}-insulin. B. Detailní pohled na B²⁶ ohyb u analogů insulinu N-methylovaných v poloze B²⁶ a porovnání se strukturou lidského insulinu (šedě). Fialově - NMeAla^{B26}-DTI-NH₂, modře - NMeAla^{B26}-insulin, žlutě - NMeTyr^{B26}-insulin. Převzato z cit.(4).

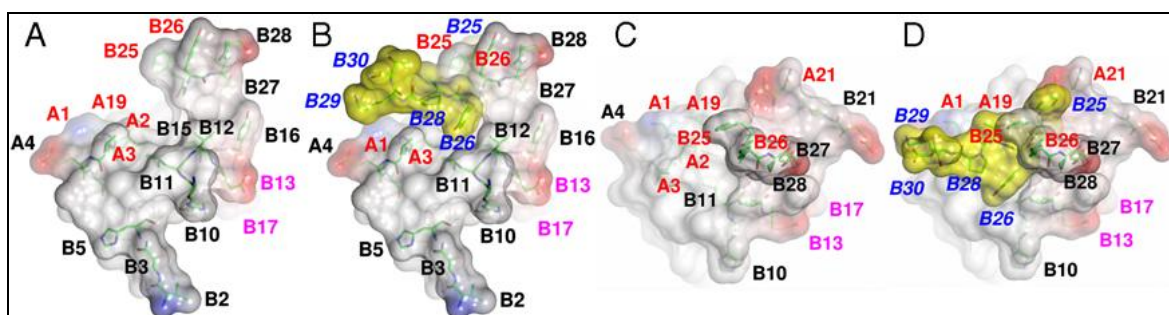


Obrázek 10. Detail struktury lidského insulinu (vyznačený žlutě) a jeho modifikovaného analogu NMeTyr^{B26}-insulinu se strukturou B²⁶ ohybu (vyznačený zeleně). Hvězdičkami jsou označeny důležité strukturní prvky: fialová - Phe B²⁴, červená - Phe B²⁵, černá - Ile A², zelená - posun (Å) Tyr A¹⁹ a vytvoření vodíkového můstku s Gln A⁵, modrá - rotace N-terminální části helixu řetězce A (ve stupních), tyrkysová - posun (v Å) N-terminální části helixu řetězce A. Převzato z cit.(4).

Nezkrácené insulinové analogy se strukturou B²⁶ ohybu

Krystalografickou analýzou nezkrácených analogů s N-methylovanými aminokyselinami v poloze B²⁶ tj. NMeAla^{B26}-insulinu a NMeTyr^{B26}-insulinu (Obrázky 9 a 10) bylo zjištěno (4), že i při plné délce C-konce B-řetězce dochází ke stejnému B²⁶ ohybu jako B²⁶ ohybu pozorovanému u zkrácených analogů. Totožný B²⁶ ohyb je u těchto analogů rovněž stabilizován zejména vodíkovým můstkem mezi CO Phe^{B24} a NH Thr^{B27}. Poloha zbylého

C-konce B-řetězce (B^{27} - B^{30}) plně následuje směr ohybu B^{26} naznačený ve zkrácených analogích. Důležité je podotknout, že jak zkrácené, tak nezkrácené analogy insulínu obsahující B^{26} ohyb mají výrazně sníženou schopnost tvořit dimery (4). Jak již bylo řečeno, monomernost insulínu je podmínkou pro přechod do tzv. aktivní formy molekuly. Na Obrázku 11 je porovnán molekulární povrch či tvar analogu $\text{NMeTyr}^{B^{26}}$ -insulínu, napodobujícího tzv. aktivní formu insulínu s molekulárním povrchem přirozeného insulínu.



Obrázek 11. Molekulární tvar předpokládané aktivní formy insulínu založený na analýze elektrostatického povrchu analogu se strukturou B^{26} ohybu, $\text{NMeTyr}^{B^{26}}$ -insulínu. Model A ukazuje důležitá nově odhalená místa A a B řetězců v důsledku přítomnosti B^{26} ohybu (červeně popsané pozice). Model B pak ukazuje strukturní tvar molekuly lidského insulínu s klasickou konformací C-konce B-řetězce (žlutě vyznačené aminokyseliny). Modely C a D jsou analogické modelům A a B otočeným o 90° (pohled svrchu). Převzato z cit.(4).

Rozdíly ve vazebných afinitách analogů s B^{26} ohybem

Zmíněný zkrácený analog insulínu $\text{NMeAla}^{B^{26}}$ -DTI- NH_2 vykazoval po provedení vazebné studie velmi zvýšenou afinitu k insulinovému receptoru (465 %). Zajímavý kontrast přineslo zjištění, že další syntetizované zkrácené analogy s methylovanými aminokyselinami v pozici B^{26} $\text{NMePhe}^{B^{26}}$ -DTI- NH_2 a $\text{NMeTyr}^{B^{26}}$ -DTI- NH_2 měly afinitu k receptoru výrazně nižší (36% a 72%) (4). Přítomnost prostorově objemnější aminokyseliny v pozici B^{26} tak zřejmě vede ke strukturní destabilizaci B^{26} ohybu a k omezení jeho celkového pozitivního vlivu na interakci molekuly s receptorem. V případě nezkrácených analogů $\text{NMeAla}^{B^{26}}$ -insulínu a $\text{NMeTyr}^{B^{26}}$ -insulínu byly získané hodnoty vazebné afinity ještě nižší (u obou 21%). Ze srovnání vazebných afinit zkráceného a nezkráceného analogu s methylovaným alaninem v pozici B^{26} ($\text{NMeAla}^{B^{26}}$ -DTI- NH_2 s 465% a $\text{NMeTyr}^{B^{26}}$ -insulin s 21% vazebné afinity) jasně vyplývá velký vliv orientace C-koncové části B-řetězce (B^{27} - B^{30}) na efektivitu vazby k receptoru. Poloha aminokyselin B^{27} - B^{30} ve struktuře $\text{NMeTyr}^{B^{26}}$ -insulínu tak nejspíše plně neodráží aktivní strukturní

uspořádání, tzv. aktivní formu insulinu fyziologicky indukovanou během vazby přirozeného insulinu na receptor. Výše popsané strukturní modifikace molekuly insulinu vedoucí ke vzniku B²⁶ ohybu nicméně pomáhají objasňovat detaily pravděpodobně probíhajících změn v konformaci molekuly hormonu při jeho vazbě na receptor a ukazují tak slibnou cestu pro syntézu dalších potenciálně klinicky využitelných monomerních a vysoce afinitních analogů.

Nové analogy insulinu s cyklickými strukturami v C-konci B-řetězce

Výše popsané výsledky se zkrácenými a nezkrácenými analogy N-methylovanými v poloze B²⁶(4) vedly skupinu Dr. J. Jiráčka z AV ČR k úvahám o optimální konformaci C-konce B-řetězce insulinu, která by odpovídala konformaci C-konce B-řetězce v jeho hypotetické nativní aktivní formě. Zejména nižší afinity nezkrácených analogů insulinu obsahujících totožný B²⁶ ohyb, jako mají vysoce aktivní analogy zkrácené o polohy B²⁷-B³⁰, mohou napovídat, že B²⁶ ohyb indukovaný N-methylací v poloze B²⁶ nemá zcela optimální konformaci právě v polohách B²⁷-B³⁰.

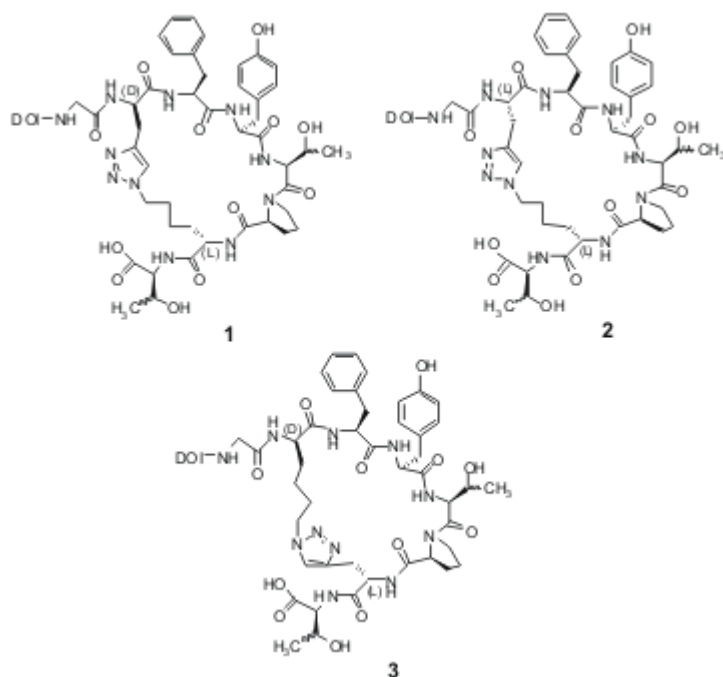
Další úvahou bylo, zda je možné stabilizovat hypotetickou aktivní konformaci (ohyb) C-konce B-řetězce insulinu kovalentně, např. cyklizací této části řetězce. Je možné, že cyklizací C-koncového oktapeptidu B²²-B³⁰ při podmínce zvolení vhodných pozic a vhodného raménka by bylo možné kovalentně stabilizovat strukturně optimální ohyb v této části insulinu a dosáhnout tak analogů s vysokou vazebnou afinitou. Takový výsledek by potvrdil hypotézu o aktivní konformaci molekuly insulinu a výsledné látky by se mohly stát vodítky pro vývoj terapeuticky účinných forem hormonu.

Pro cyklizaci byla zvolena dnes velmi hojně používaná Huisgenova Cu^I-katalyzovaná azid-alkynová cykloadice též populárně nazývaná “click chemistry” (34). Tato reakce mezi azidy a alkyny probíhá za vzniku 1,4-substituovaných triazolů při katalýze ionty jednomocné mědi velmi rychle, kvantitativně, vysoce selektivně a i ve vodném prostředí. Výchozí N-terminálně chráněné (Fmoc) azidy a alkyny aminokyselin jsou navíc kompatibilní s podmínkami syntézy na pevné fázi.

V první fázi byly v laboratoři Dr. J. Jiráčka pro cyklizaci zvoleny pozice B²⁴ a B²⁹. Pozice B²⁴ je tolerantní pro substituci D-aminokyselinami (16;26) či glycinem (27) a pozice B²⁹ nemá významný vliv na afinitu interakce s receptorem(35-37).

Za použití komerčních N-Fmoc-propargylglycinů v L či D formě a v laboratoři připravených N^{α} -Fmoc- N^{ϵ} -azidolysinů v L či D formě byly připraveny nové tři analogy insulínu následujících obecných struktur: cyklo[G-(D-Prg^{B24})-F-Y-T-P-(L-K_{N3}^{B29})-T]-insulín (**1**), cyklo[G-(L-Prg^{B24})-F-Y-T-P-K-(L-K_{N3})^{B29}-T]-insulín (**2**) a cyklo[G-(D-K_{N3}^{B24})-F-Y-T-P-(L-Prg^{B29})-T]-insulín (**3**) kde Prg je propargylglycin v L či D formě a K_{N3} je N^{ϵ} -azidolysin. Struktury látek **1-3** jsou rovněž zobrazeny na Obrázku 12. Látky se liší vzájemnou pozicí a chiralitou původních prekurzorů Prg a K_{N3} jejichž reakcí vznikl triazolový kruh a tím i cyklizace peptidu (D-Prg^{B24}/L-K_{N3}^{B29} v analogu **1**, L-Prg^{B24}/L-K_{N3}^{B29} v analogu **2** a D-K_{N3}^{B24}/L-Prg^{B29} v analogu **3**). Metodika přípravy látek tohoto typu bude podrobně popsána v této diplomové práci. Testování vazebné afinity těchto analogů vůči receptoru insulínu v membránách IM-9 lymfocytů ukázalo, že látky vykazují velmi malou afinitu vůči receptoru insulínu (0,33% u analogu **1**, 0,13% u analogu **2** a 0,5% u analogu **3** vzhledem k vazebné afinitě nativního insulínu, která je 100%).

Na základě nízkých afinit analogů **1-3** bylo rozhodnuto pokračovat dále v syntéze podobných látek a pokusit se za pomoci dalších variant umístění a chiralidy prekurzorů pro cykloadici (alkyn a azid) dosáhnout zvýšené vazebné afinity výsledných analogů. Jako další možnost se jevílo použití komerčně dostupné (S)-5-azido-2-pentanové kyseliny (L-Pent_{N3}), umožňující kratší přemostění kruhu v oktapetidu a zároveň přemístění prekurzorů do pozic B²⁷ a B²⁹, což by ponechalo klíčové aminokyseliny v polohách B²⁴-B²⁶ intaktní.



Obrázek 12. Struktury analogů **1-3**. Zobrazena je pouze chemická struktura C-koncového oktapetidu B-řetězce. Tento oktapetid je připojen ke zbytku insulínu (des (B²²-B³⁰) desoktapetid insulínu (DOI)) peptidovou vazbou mezi N-koncovou aminokyselinou glycinu v poloze B²³ a karboxylem argininu v poloze B²² desoktapetid insulínu.

Cíl práce

Cílem této práce bylo připravit tři nové analogy insulínu obecných vzorců:

cyklo[G-(D-Pr^{B24}_G)-F-Y-T-P-(D-K^{B29}_{N3})-T]-insulín,

cyklo[G-(D-K^{B24}_{N3})-F-Y-T-P-(D-Pr^{B29}_G)-T]-insulín,

cyklo[G-F-F-Y-(L-Pent^{B27}_{N3})-P-(L-Pr^{B29}_G)T]-insulín,

a zjistit jejich vazebné afinity vůči receptoru insulínu *in vitro*.

Metody

Použité chemikálie a materiály

Výchozí látkou pro přípravu des (B^{23} - B^{30}) oktapeptid insulinu (DOI), který byl předem připraven v laboratoři Dr. Jiráčka, byl vepřový insulin (šarže 1603/06) od firmy SPOFA (Česká republika). Lidský rekombinantní insulin byl pořízen u firmy Sigma-Aldrich (Německo). Pro štěpení insulinu a enzymovou semisyntézu byl použit TPCK-Trypsin (T-1426) dodaný od firmy Sigma-Aldrich (Německo). Aminokyseliny potřebné pro syntézu oligopeptidů, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, byly zakoupeny u firmy NovaBiochem-Merck (Švýcarsko). N-Fmoc-propargylglyciny v L či D formě a (S)-5-azido-2-pentanová kyselina byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich (Německo). N^{α} -Fmoc- N^{ϵ} -azidolysiny v L či D formě byly připraveny v laboratoři Dr. Václava Vaňka (ÚOCHB AV ČR). Další materiály potřebné pro syntézu peptidů: 2-Cl-tritylová pryskyřice a kondenzační činidlo HBTU byly také zakoupeny u firmy NovaBiochem-Merck. *In vitro* testování na IM-9 lidských lymfocytech (ATCC, Manassas, USA; LGC Standards, Polsko) bylo provedeno s použitím značeného lidského insulinu (mono- 125 I-Tyr A14 -insulin, Perkin-Elmer, USA). Médium RPMI-1640, L-glutamin, penicilin/streptomycin a fetální hovězí sérum byly zakoupeny u firmy Invitrogen (Carlsbad, California, USA). Všechny ostatní chemikálie a rozpouštědla byly dodány firmou Sigma-Fluka-Aldrich a byly p.a. čistoty.

Použité přístroje

Byly použity tyto přístroje: centrifuga Jouan CR3i (Francie), lyofilizační přístroj Heto FD3 (Dánsko), spektrofotometr Lambda 25 (Perkin-Elmer, USA), vakuová odparka Heidolph WB 2000 (Německo), vysokoúčinná kapalinová chromatografie byla prováděna na přístrojích firmy Waters (USA) - Waters 600 Controller, detektor Waters 2487 a měření radioaktivity bylo prováděno na přístroji γ -counter Wizard 1470 (Perkin Elmer, USA).

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenou fází (RP-HPLC)

Analytické kontroly průběhu reakcí a čistoty látek stejně jako i následné dělení a izolace produktů byly prováděny metodou RP-HPLC na přístrojích firmy Waters (Waters 600 Controller, detektor Waters 2487, ČR). Pro analytická stanovení byla používána analytická kolona firmy Watrex (Nucleosil 120-5 C-18, 250 × 4 mm, průtok 1 ml/min), pro purifikaci produktů semisyntéz semipreparativní kolona firmy Watrex (Nucleosil 120-5 C-18, 250 × 8 mm, průtok 3 ml/min) a pro purifikaci výchozích oligopeptidů preparativní kolona firmy Phenomenex (Luna C-18, 250 × 21,2 mm, průtok 9 ml/min). Proces vymývání z kolony byl zajištěn stoupajícími procenty (v/v) acetonitrilu v deionizované vodě za přítomnosti 0,1% (v/v) TFA. Gradient acetonitrilu měl pro oligopeptidy a analogy insulinu různý průběh. Pro analytické účely (kolona Nucleosil 120-5 C-18, 250 × 4 mm, průtok 1 ml/min) či preparaci výsledných analogů insulinu (kolona Nucleosil 120-5 C-18, 250 × 8 mm, průtok 3 ml/min) byl použit následující gradient složek A (0,1% TFA ve vodě) a B (80% acetonitril a 0,1% TFA ve vodě): 0 min - 90%A/10% B, 1 min - 65%A/35% B, 21 min - 55%A/45% B, 35 min - 45%A/55% B, 36 min - 10%A/90%B, 37 min - 10%A/90% B a 37,1 min - 90%A/10% B. Detekce byla prováděna měřením absorbance při 258 a 218 nm. Pro preparaci lineárních a cyklických oktapeptidů (kolona Luna, Phenomenex C-18, 250 × 21,2 mm, průtok 9 ml/min) byl použit gradient: 0 min - 90%A/10%B, 30 min - 0%A/100% B, 31 min - 90%/10% B. Pro vyhodnocení a záznam získaných dat byl použit program Clarity Lite (firma Data Apex, ČR).

Syntéza lineárních oktapeptidů

Lineární oktapeptidy byly připraveny metodou syntézy na pevné fázi (SPPS) (38). Jako polymerní nosič byla použita vysoce acidolabilní 2-Cl-tritylová pryskyřice (obvykle v množství odpovídajícím 400 μmolům aktivních skupin). Manuální syntéza probíhala v plastové injekční stříkačce s fritou. Pro syntézu oktapeptidů byly použity aminokyseliny s primárními α-aminoskupinami chráněnými pomocí 9-fluorenylmethoxykarbonylu (Fmoc) (zabraňující nechtěnému prodlužování řetězce) a s chráněnými hydroxylovými skupinami pomocí terciárního butylu (tBu). Navázání první aminokyseliny na pryskyřici

(39) bylo docíleno přidavkem aminokyseliny (1 ekvivalent) a N,N-diisopropylethylaminu (DIPEA) (3 ekvivalenty) k pryskyřici (1 ekvivalent) v dichlormethanu (DCM). Reakce probíhala asi 2 hodiny. Poté byla pryskyřice s navázanou aminokyselinou ponechána cca 15 minut ve směsi DCM:MeOH:DIPEA (17:2:1). Tím došlo k deaktivování a zablokování zbývajících nezreagovaných chloridových skupin pryskyřice. Chránicí skupina (Fmoc) primární α -aminoskupiny byla odstraněna opakovaným (5 a 20 min) působením 30% roztoku piperidinu v N,N-dimethylformamidu (DMF). Úspěšnost reakce byla hodnocena spektrofotometricky měřením absorpance vzniklého dibenzofulven-piperidinového komplexu při vlnové délce 301 nm ($\epsilon = 7040 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), což umožňuje kvantifikovat množství odštěpené skupiny Fmoc a tím i množství navázané aminokyseliny. Navázání další aminokyseliny bylo katalyzováno použitím kondenzačního činidla 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorofosfátu (HBTU) a DIPEA v prostředí N-methyl-2-pyrrolidonu (NMP). Reakce probíhala vždy nejméně 1 h. Poměr látkových množství jednotlivých složek reakce (aminokyselina: HBTU : DIPEA) byl roven 3:3:6 vzhledem k aminoskupině přítomné na pryskyřici (1 ekvivalent). V alternativním případě, kdy byla směs ponechána reagovat přes noc, bylo použito činidel N-hydroxybenzotriazolu (HOBT) a N,N-dicyklohexylkarbodiimidu (DIC) v prostředí směsi rozpouštědel DCM a NMP v poměru 1:1. V tomto případě bylo látkové množství všech složek reakce ekvimolární. Kontrola úspěšného provedení reakce byla provedena Kaiserovým testem na přítomnost primárních aminoskupin (40). Podle výsledku testu se buď zopakovala reakce se stejnou aminokyselinou, nebo se přistoupilo k odstranění chránicí skupiny Fmoc poslední navázané aminokyseliny. Oktapeptid byl z polymerního nosiče pryskyřice odštěpen působením směsi 20% 2,2,2-trifluorethanolu (TFE) a 20% kyseliny octové (AcOH) v DCM po dobu 2 h. Následně byl produkt štěpení odpařen do sucha na vakuové rotační odparce. Zbylé chránicí skupiny (tBu) byly odstraněny působením směsi 50% kyseliny trifluoroctové (TFA), 2% triisopropylsilanu a 2% H_2O v DCM po dobu 1h. Produkt byl poté opět odpařen do sucha, 3x promyt diethyletherem a rozpuštěn v 10% kyselině octové. Oktapeptid byl dále přečištěn pomocí RP-HPLC, lyofilizován a identifikován pomocí hmotnostní spektrometrie. V případě vysoké čistoty byl surový oktapeptid dále použit bez RP-HPLC purifikace (viz dále).

Cyklizace oktapeptidů

Příprava cyklických forem oktapeptidů probíhala za využití Huisgenovy azid-alkynové cykloadice katalyzované mědnými ionty Cu^I (tzv. „click“ chemistry) (34) metodou podle Isaada a kol. (41). RP-HPLC purifikovaný (50 mg) či surový lineární oktapeptid (150 mg) byl rozpuštěn ve směsi H_2O :terciární butanol (2:1) v koncentraci 0,08 mM. Do reakce byly dále přidány síran mědnatý ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) a kyselina askorbová rozpuštěné v minimálním množství směsi rozpouštědel H_2O : terciární butanol (2:1), reakce byla rychle zamíchána a ponechána stát bez míchání v laboratorní teplotě. Poměr látkových množství složek reakce byl oktapeptid : $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: kyselina askorbová (1:14:14). Průběh reakce byl monitorován pomocí analytické RP-HPLC. Po kompletaci reakce (téměř okamžité vymizení lineárního oktapeptidu a detekce nové látky s rozdílným retenčním časem při RP-HPLC) byl z reakční směsi odpařen terciární butanol na vakuové odparce. Zbylá vodná fáze obsahující produkt a sole byla následně odsolena na C18 Chromabond kolonce (1 x 5 cm). Cyklický oktapeptid byl z kolonky, po důkladném promytí vodou, eluován roztokem 80% acetonitrilu (ACN) s 0,1% TFA v H_2O . Cyklický oktapeptid byl dále purifikován pomocí RP-HPLC, lyofilizován a identifikován hmotnostní spektroskopií.

Enzymová semisyntéza insulinových analogů

Enzymová semisyntéza insulinových analogů probíhala podle Svobody a kol. (42;43) a Žákové a kol.(44). Cyklický oktapeptid a des ($\text{B}^{23}\text{-B}^{30}$) oktapeptid insulin (DOI) byly spojeny kondenzační reakcí katalyzovanou trypsinem. Cyklický oktapeptid (150 mM) byl rozpuštěn ve 110 μl dimethylformamidu (DMF) a 40 μl 50 mM octanu vápenatého. K reakční směsi byl poté přidán DOI (30 mM) a 2,5 mg TPCK-trypsinu rozpuštěného v 50 μl DMF (molárním poměr enzym:DOI byl 1:50). pH reakční směsi (200 μl) bylo upraveno na hodnotu 6,9-7,1 přidáním několika mikrolitrů N-methylmorpholinu a ověřeno pH papírkem. Průběh reakce byl sledován pomocí RP-HPLC. Při příliš pomalém průběhu reakce byl do reakční směsi přidán navíc 1 mg TPCK-trypsinu. Reakce byla ukončena přidávkem acetonu, který způsobil vysrážení peptidových produktů. Vzniklý sediment byl rozpuštěn v 10% kyselině octové. Jednotlivé produkty semisyntetické reakce byly

separovány pomocí RP-HPLC, lyofilizovány a následně identifikovány pomocí hmotnostní spektrometrie.

Hmotnostní spektrometrie

Identifikace lineárních oktapeptidů, cyklických oktapeptidů a výsledných insulinových analogů byla provedena pomocí hmotnostní spektrometrie v Laboratoři hmotnostní spektrometrie ÚOCHB AV ČR na přístroji LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, Německo, USA) metodou ESI v pozitivním iontovém módu.

Testování vazebných afinit insulinových analogů *in vitro*

K testování vazebných afinit insulinových analogů vůči receptoru insulinu *in vitro* byla použita buněčné linie lidských lymfocytů IM-9 s vysokou mírou exprese insulinového receptoru. Principem testování vazebné afinity insulinových analogů je kompetice analogu s insulinem radioaktivně značeným pomocí I^{125} ($\tau=60$ dní) o vazebné místo na insulinovém receptoru. Při testování byla použita metodika postupu podle De Meytse (45).

Buňky IM-9 byly pěstovány podle doporučeného postupu dodavatele (ATCC, Manassas, USA; LGC Standards, Polsko). Buňky rostly v podmínkách zvlhčené atmosféry s 5% obsahem CO_2 , při teplotě 37 °C, v médiu RPMI-1640 obsahujícím 10% fetální hovězí sérum, 2 mM glutamin a 100 U/ml penicilinu/streptomycinu. Pro zajištění optimálních podmínek růstu byly buňky pasážovány 3x týdně. Buňky byly nejdříve spočítány a poté naředěny na koncentraci 2 miliony/ml.

Zásobní roztoky insulinu a analogů byly připraveny v 1% kyselině octové. Koncentrace byly určeny za použití měření absorbance při 280 nm a extinkčních koeficientů (ϵ) 5840 $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ pro lidský insulin a analogy obsahující čtyři tyrosiny v molekule a 4560 $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ pro analogy s pouze třemi tyrosiny. Ředěním vazebným pufrům (viz níže) byly následně připraveny roztoky o klesající koncentraci testovaného analogu insulinu.

V reakční směsi byly buňky inkubovány vždy s roztokem insulinového analogu o příslušné naředěné koncentraci a konstantním množstvím radioaktivně značeného insulinu (20 000 dpm). Reakce probíhala po dobu 2,5 h, při teplotě 15°C ve vazebném pufru o následujícím složení: 100 mM HEPES/NaOH pH 7,6; 100 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,3 mM $MgSO_4$, 1mM EDTA, 10 mM glukóza, 15 mM octan sodný a 1% BSA. Celkový reakční objem byl 500 μl . Směs byla míchána každých 30 min. Z každé zkumavky byly

vytvořeny duplikáty o objemu 200 μ l a reakce byla zastavena přidavkem 200 μ l vazebného pufru o teplotě 4 °C. Směs byla dále centrifugována při 15 000 g po dobu 10 min při 4°C. Po odsátí supernatantu byla změřena radioaktivita pelety na γ -počítači. Získaná data byla vyhodnocena v programu GraphPad Prism 5.0 metodou analýzy podle modelu vazby do jednoho vazebného místa a určena hodnota disociační konstanty (K_d) analogu vůči receptoru. Použitá koncentrace 125 I-radioaktivně značeného insulinu byla 0,01 nM. Jako K_d 125 I-značeného insulinu vůči receptoru bylo použita hodnota 0.3 nM (45).

Výsledky

Syntéza lineárních oktapeptidů

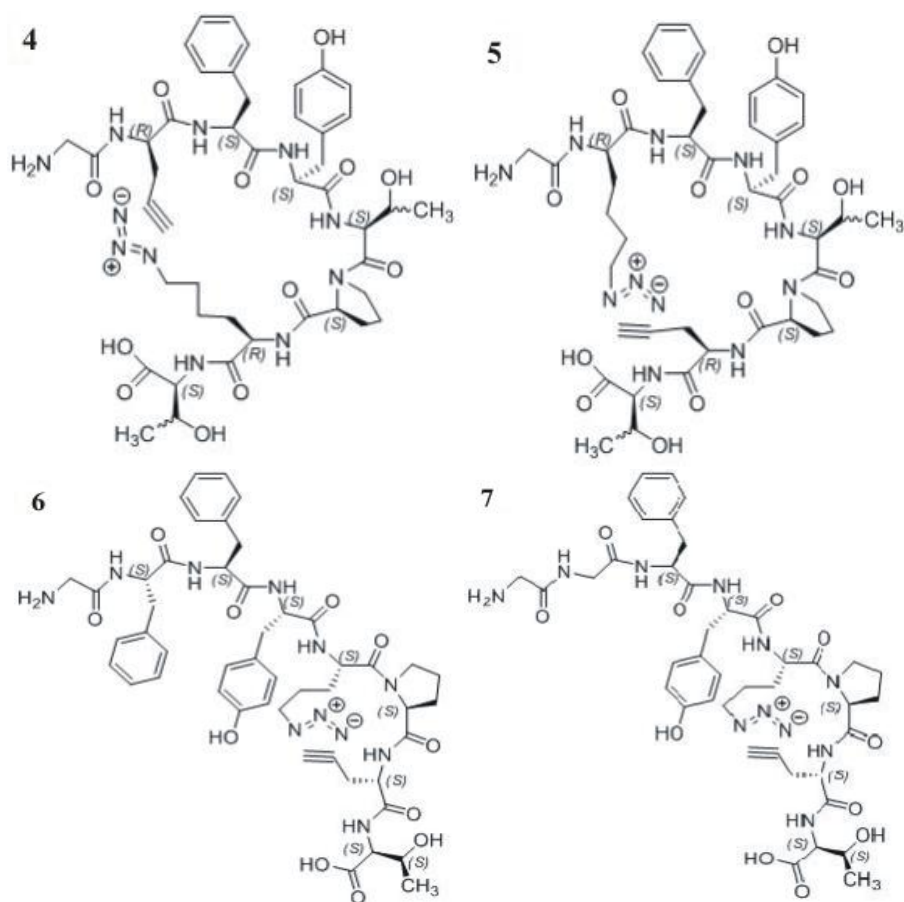
Syntézou na pevné fázi byly připraveny čtyři lineární oktapeptidy označené jako látky **4-7** (Obrázek 13 a Tabulka 1). První dva z nich (látky **4** a **5**) byly připraveny s aminokyselinami D-propargylglycinem (D-Prg) a N^ε-azidolysinem (D-K_{N3}) v polohách B²⁴ a B²⁹ (Obrázek 13 A a B). Druhé dva peptidy (**6** a **7**) byly připraveny s (S)-5-azido-2-pentanovou kyselinou (L-Pent_{N3}) v poloze B²⁷ a L-propargylglycinem (L-Prg) v poloze B²⁹ (Obrázek 13 C a D).

Důvodem přípravy peptidu **7**, který není specifikován v Cílech diplomové práce a který oproti nativnímu insulinu dále ještě obsahuje Gly v poloze B²⁴ namísto Phe, byla neúspěšnost semisyntézy za použití cyklického peptidu **10** (vzniklého cyklizací peptidu **6**). Příčiny neúspěšnosti této semisyntézy a důvody záměny PheB²⁴ za GlyB²⁴ jsou diskutovány v Diskusi.

Peptidy **4** a **5** byly dále purifikovány pomocí RP-HPLC. Výtěžky syntetické reakce peptidů **4** a **5** byly po RP-HPLC purifikaci vypočítány vztahením k množství použité 2-Cl-tritylové pryskyřice. Peptidy **6** a **7** byly pro další zpracování z důvodu jejich velmi uspokojivé čistoty a z důvodu ušetření času použity pro cyklizaci v surové formě a proto u nich výtěžek syntetické reakce nebyl stanoven. Všechny čtyři lineární oktapeptidy byly identifikovány hmotnostní spektrometrií dle jejich monoisotopické relativní molekulové hmotnosti (Tabulka 1).

Tabulka 1. Výtěžky syntéz lineárních oktapeptidů **4-7** a jejich příslušné experimentální (exp.) a teoretické (teor.) monoisotopické relativní molekulové hmotnosti (M_r).

lineární oktapeptid, číslo	struktura lineárního oktapeptidu	výtěžek syntézy po RP-HPLC	M _r (teor.)	M _r (exp.)
4	[G-(D-Prg ^{B24})-F-Y-T-P-(D-K _{N3} ^{B29})-T]	45%	933,43	933,43
5	[G-(D-K _{N3} ^{B24})-F-Y-T-P-(D-Prg ^{B29})-T]	48%	933,43	933,43
6	[G-F-F-Y-(L-Pent _{N3} ^{B27})-P-(L-Prg ^{B29})-T]	nestanoven	965,44	965,46
7	[G-G-F-Y-(L-Pent _{N3} ^{B27})-P-(L-Prg ^{B29})-T]	nestanoven	875,39	875,39



Obrázek 13. Struktura připravených lineárních oktapeptidů: A = lineární peptid **4**, [G-(D-Pr^{B24}_g)-F-Y-T-P-(D-K^{B29}_{N3})-T]; B = lineární peptid **5**, [G-(D-K^{B24}_{N3})-F-Y-T-P-(D-Pr^{B29}_g)-T]; C = lineární peptid **6**, [G-F-F-Y-(L-Pent^{B27}_{N3})-P-(L-Pr^{B29}_g)-T]; D = lineární peptid **7**, [G-G-F-Y-(L-Pent^{B27}_{N3})-P-(L-Pr^{B29}_g)-T].

Cyklizace oktapeptidů

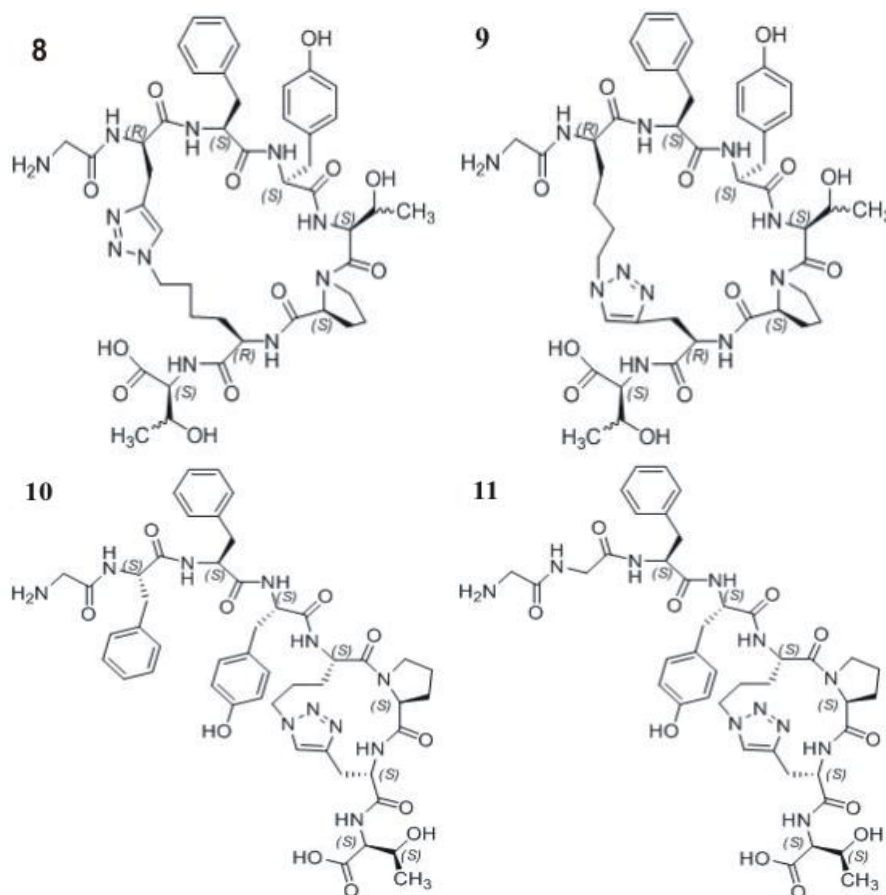
Ze všech čtyř lineárních oktapeptidů byly Huisgenovou azid-alkynovou Cu^I katalyzovanou cykloadicí připraveny jejich cyklické formy, látky **8-11** (Tabulka 2) (Obrázek 14). Úspěšné provedení reakce bylo prokázáno pomocí RP-HPLC sledováním jasného posunu retenčního času vzniklého cyklického peptidu vzhledem k lineárnímu. Příklad takové RP-HPLC analýzy je uveden na Obrázku 15.

Všechny čtyři cyklické oktapeptidy byly následně purifikovány pomocí RP-HPLC a identifikovány hmotnostní spektrometrií (Tabulka 2). Výtěžek cyklizační reakce byl vypočítán z poměru množství použitého lineárního peptidu k množství jeho nově vzniklého cyklického analogu. Při přípravě cyklických oktapeptidů **10** a **11** byly použity jejich lineární

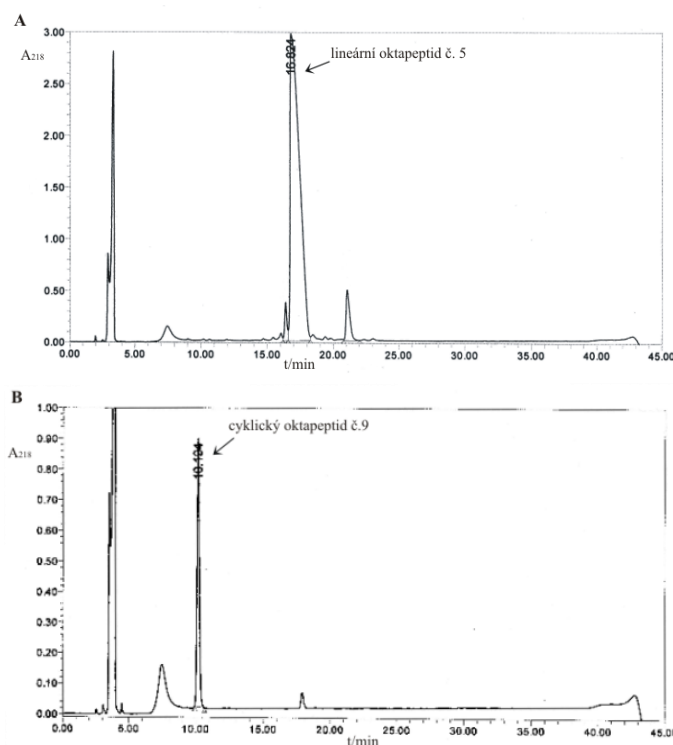
formy v surovém stavu (příslušné peptidy **6 a 7**). Pro výpočet jejich výtěžků se vycházelo z úvahy, že příslušné lineární peptidy byly zcela čisté.

Tabulka 2. Výtěžky přípravy jednotlivých cyklických oktapeptidů **8-11** a jejich příslušné experimentální (exp.) a teoretické (teor.) monoisotopické relativní molekulové hmotnosti (M_r).

cyklický oktapeptid, číslo	struktura cyklického oktapeptidu	výtěžek cyklizace po RP-HPLC	M_r (teor.)	M_r (exp.)
8	cyklo[G-(D-Pr ^{B24}) ^{B24}]-F-Y-T-P-(D-K _{N3} ^{B29})-T]	62%	933,43	933,43
9	cyklo[G-(D-K _{N3} ^{B24})-F-Y-T-P-(D-Pr ^{B29})-T]	61%	933,43	933,43
10	cyklo[G-F-F-Y-(L-Pent _{N3} ^{B27})-P-(L-Pr ^{B29})-T]	40%	965,44	965,46
11	cyklo[G-G-F-Y-(L-Pent _{N3} ^{B27})-P-(L-Pr ^{B29})-T]	38%	875,39	875,39



Obrázek 14. Struktura cyklických oktapeptidů **8-11**: A = cyklický oktapeptid **8**, cyklo[G-(D-Pr^{B24})-F-Y-T-P-(D-K_{N3}^{B29})-T]; B = cyklický oktapeptid **9**, cyklo[G-(D-K_{N3}^{B24})-F-Y-T-P-(D-Pr^{B29})-T]; C = cyklický oktapeptid **10**, cyklo[G-F-F-Y-(L-Pent_{N3}^{B27})-P-(L-Pr^{B29})-T]; D = cyklický oktapeptid **11**, cyklo[G-G-F-Y-(L-Pent_{N3}^{B27})-P-(L-Pr^{B29})-T].



Obrázek 15. Srovnání retenčních časů lineárního oktapeptidu **5** ([G-(D-K_{N3}^{B24})-F-Y-T-P-(D-Prg^{B29})-T]) (A, t_r = 16,02 min) a jeho cyklické formy **9** (cyklo[G-(D-K_{N3}^{B24})-F-Y-T-P-(D-Prg^{B29})-T]) (B, t_r = 10,19 min).

Enzymová semisyntéza insulinových analogů

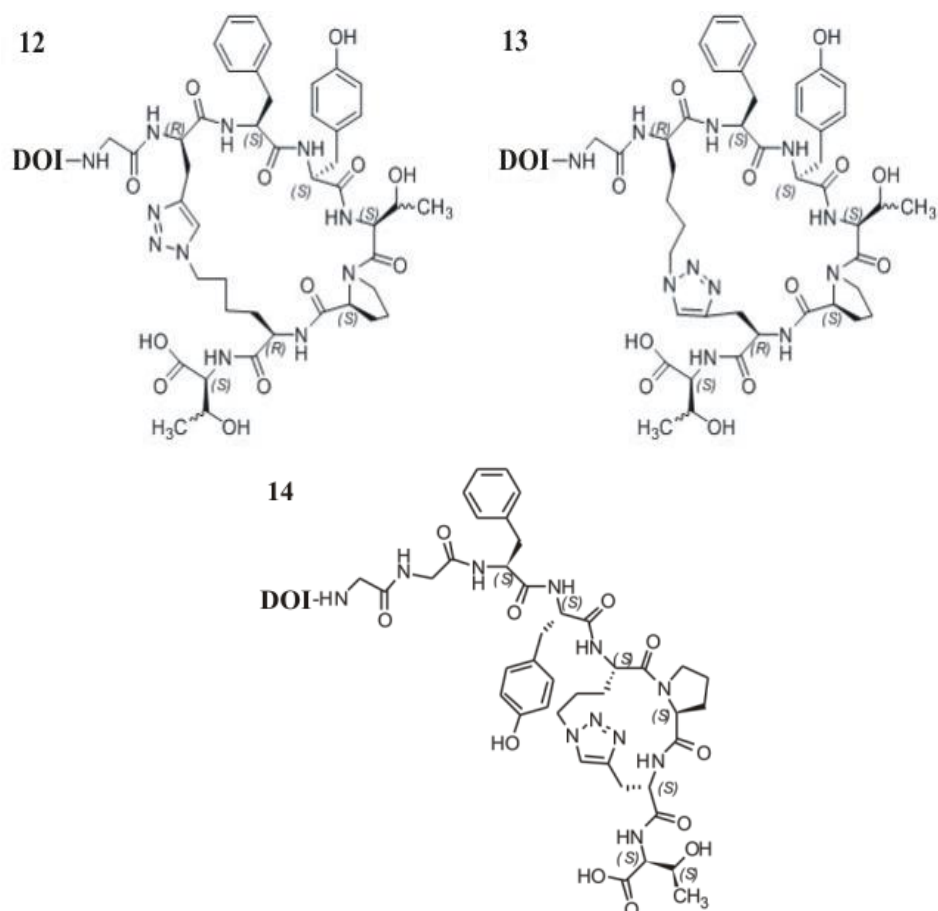
Insulinové analogy **12-14** (Obrázek 16) byly připraveny trypsinem katalyzovanou semisyntetickou reakcí příslušných cyklických oktapeptidů (**8**, **9** a **11**) s DOI. Jak již bylo zmíněno výše, semisyntetická reakce DOI s cyklickým oktapeptidem **10** nebyl úspěšná a příslušný analog insulinu se nepodařilo připravit.

Průběh reakcí byl sledován pomocí analytické RP-HPLC. Vzniklé produkty byly od sebe separovány pomocí semi-preparativní RP-HPLC (Obrázek 17) a čistota výsledných insulinových analogů dále zkontrolována pomocí analytické RP-HPLC (Obrázek 18). Analogy byly identifikovány hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením (HR) (Tabulka 3) (Obrázky 19-21).

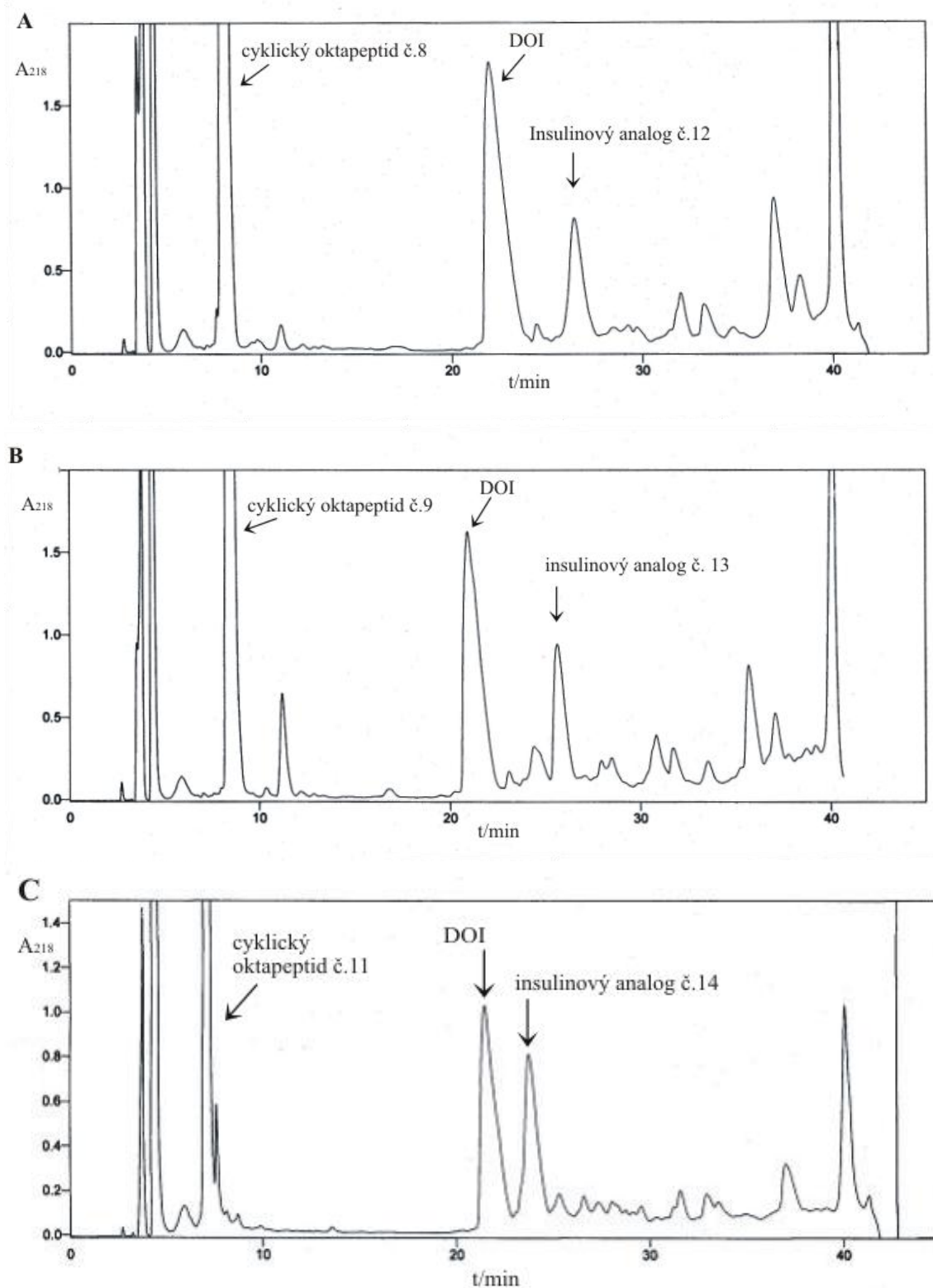
Vypočítané výtěžky enzymových semisyntéz po purifikaci produktů pomocí RP-HPLC byly vztaženy k množství použitého DOI, který byl limitující složkou reakce.

Tabulka 3. Výtěžky semisyntéz jednotlivých insulinových analogů **12-14** a jejich příslušné experimentální (exp.) a teoretické (teor.) monoisotopické relativní molekulové hmotnosti (M_r).

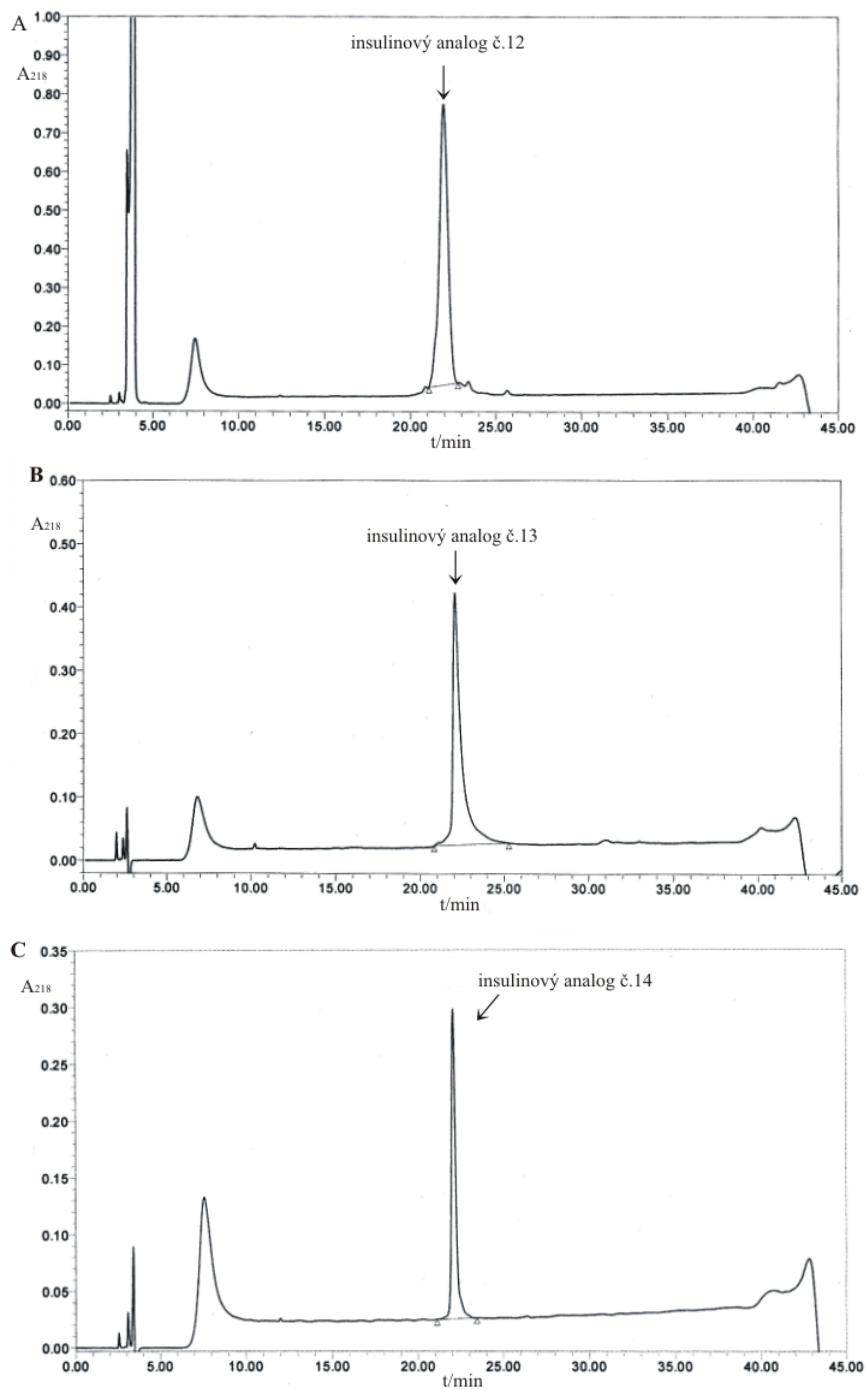
insulinový analog, číslo	struktura insulinového analogu	výtěžek	M_r (teor.)	M_r (exp.)
12	cyklo[G-(D-Prg ^{B24})-F-Y-T-P-(D-K _{N3} ^{B29})-T]-insulin	25%	5777,60	5777,61
13	cyklo[G-(D-K _{N3} ^{B24})-F-Y-T-P-(D-Prg ^{B29})-T]-insulin	17%	5777,60	5777,60
14	cyklo[G-G-F-Y-(L-Pent _{N3} ^{B27})-P-(L-Prg ^{B29})-T]-insulin	4%	5719,56	5719,56



Obrázek 16. Struktura připravených insulinových analogů **12-14**: insulinový analog **12**, cyklo[G-(D-Prg^{B24})-F-Y-T-P-(D-K_{N3}^{B29})-T]-insulin; insulinový analog **13**, cyklo[G-(D-K_{N3}^{B24})-F-Y-T-P-(D-Prg^{B29})-T]-insulin; insulinový analog **14**, cyklo[G-G-F-Y-(L-Pent_{N3}^{B27})-P-(L-Prg^{B29})-T]-insulin.



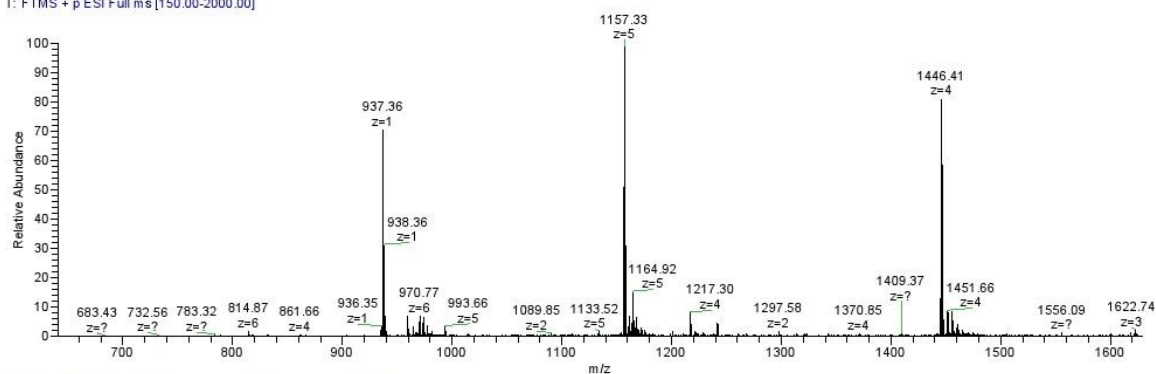
Obrázek 17. Záznam chromatografického dělení produktů enzymových semisyntéz s vyznačenými identifikovanými frakcemi cyklických oktapeptidů, DOI a příslušných insulinových analogů. A - semisyntéza insulinového analogu **12**, cyklo[G-(D-Pr^{B24})-F-Y-T-P-(D-K_{N3}^{B29})-T]-insulin; B - semisyntéza insulinového analogu **13**, cyklo[G-(D-K_{N3}^{B24})-F-Y-T-P-(D-Pr^{B29})-T]-insulin; C - semisyntéza insulinového analogu **14**, cyklo[G-G-F-Y-(L-Pent_{N3}^{B27})-P-(L-Pr^{B29})-T]-insulin.



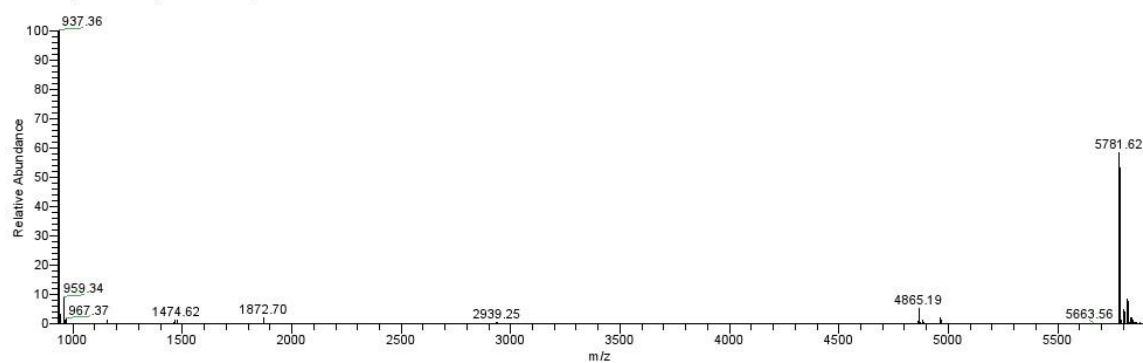
Obrázek 18. Chromatografické záznamy purifikovaných insulinových analogů:
 A - insulinový analog **12**, cyklo[G-(D-Pr^{B24}_{N3})-F-Y-T-P-(D-K^{B29}_{N3})-T]-insulin,
 B - insulinový analog **13**, cyklo[G-(D-K^{B24}_{N3})-F-Y-T-P-(D-Pr^{B29}_{N3})-T]-insulin,
 C - insulinový analog **14**, cyklo[G-G-F-Y-(L-Pent^{B27}_{N3})-P-(L-Pr^{B29}_{N3})-T]-insulin.

ESI, 2750 V, 2010111110JJ 251010 3

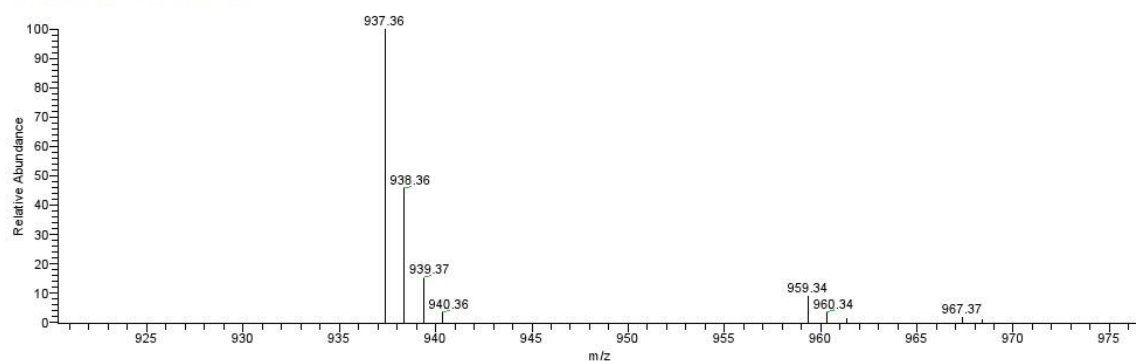
JJ 251010 3 #28-29 RT: 1.13-1.17 AV: 2 NL: 1.51E7
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]



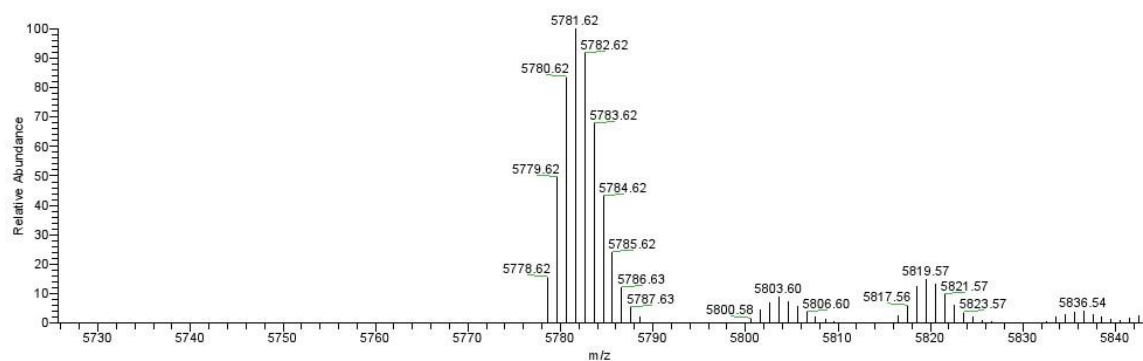
JJ 251010 3_XT_00001_MHp_#1 RT: 1.00 AV: 1 NL: 1.04E7
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]



JJ 251010 3_XT_00001_MHp_#1 RT: 1.00 AV: 1 NL: 1.04E7
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]



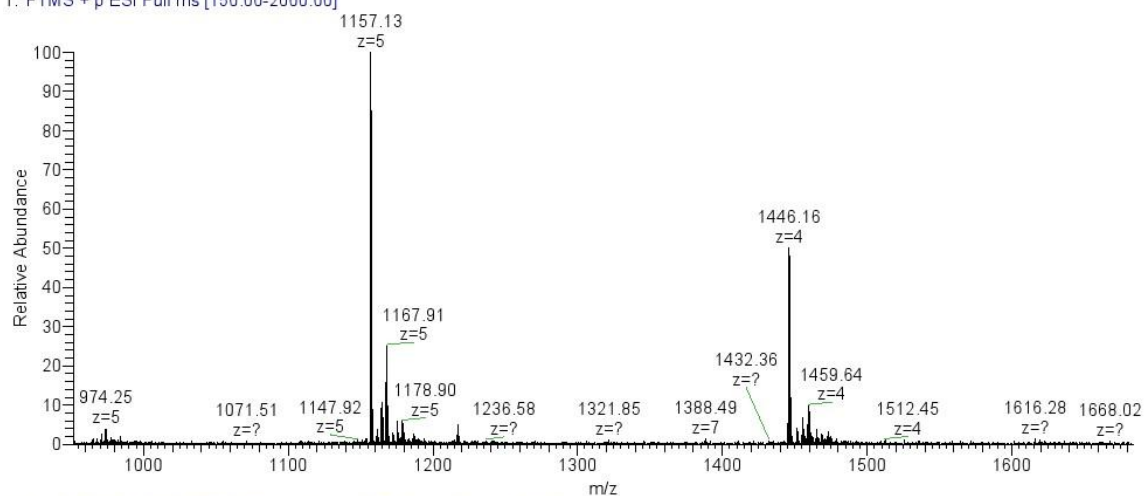
JJ 251010 3_XT_00001_MHp_#1 RT: 1.00 AV: 1 NL: 6.05E6
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]



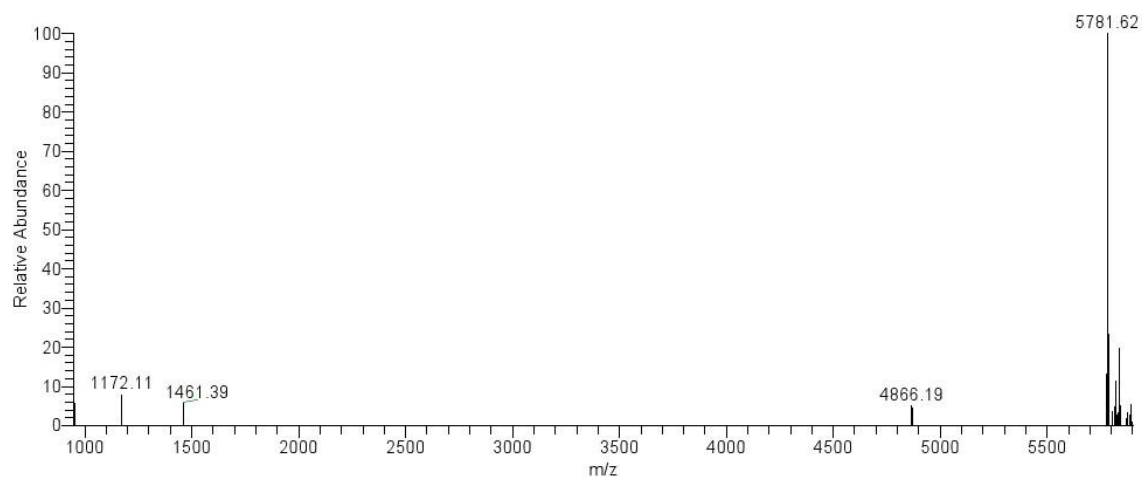
Obrázek 19. Hmotnostní spektrum insulinového analogu **12** (cyklo[G-(D-Prg^{B24})-F-Y-T-P-(D-K_{N3}^{B29})-T]-insulin).

ESI, 275 C, 80% MeOH, 0.00J Semi 151210-3

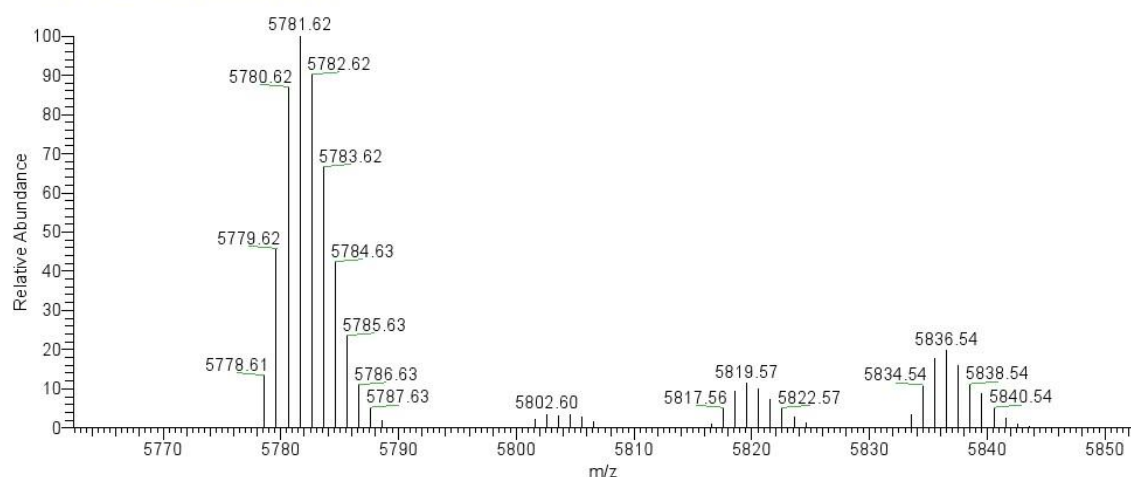
JJ Semi 151210-3 #32-33 RT: 0.93-0.96 AV: 2 NL: 2.54E6
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]



JJ Semi 151210-3_XT_00001_MHp_#1 RT: 1.00 AV: 1 NL: 8.26E5
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]

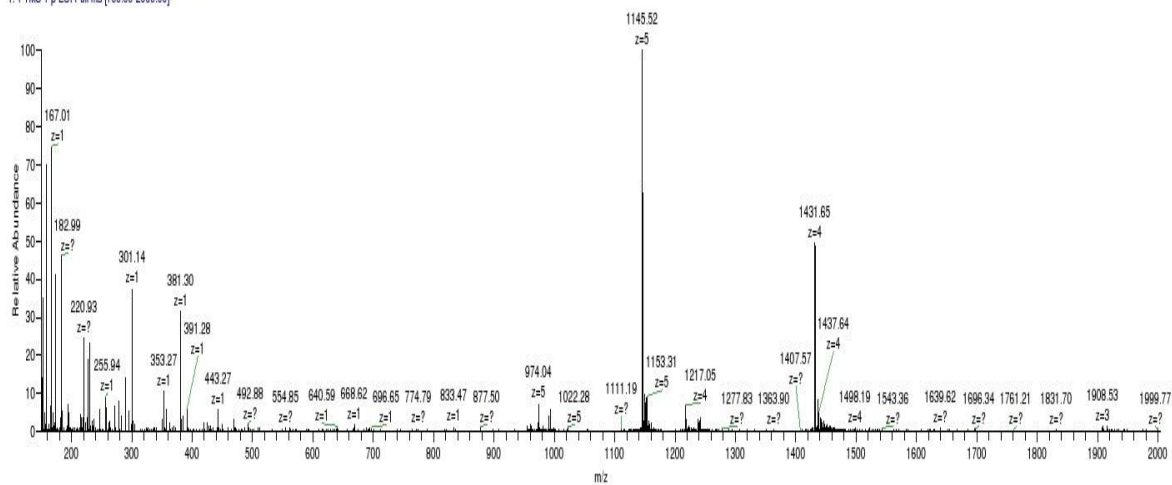


JJ Semi 151210-3_XT_00001_MHp_#1 RT: 1.00 AV: 1 NL: 8.26E5
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]

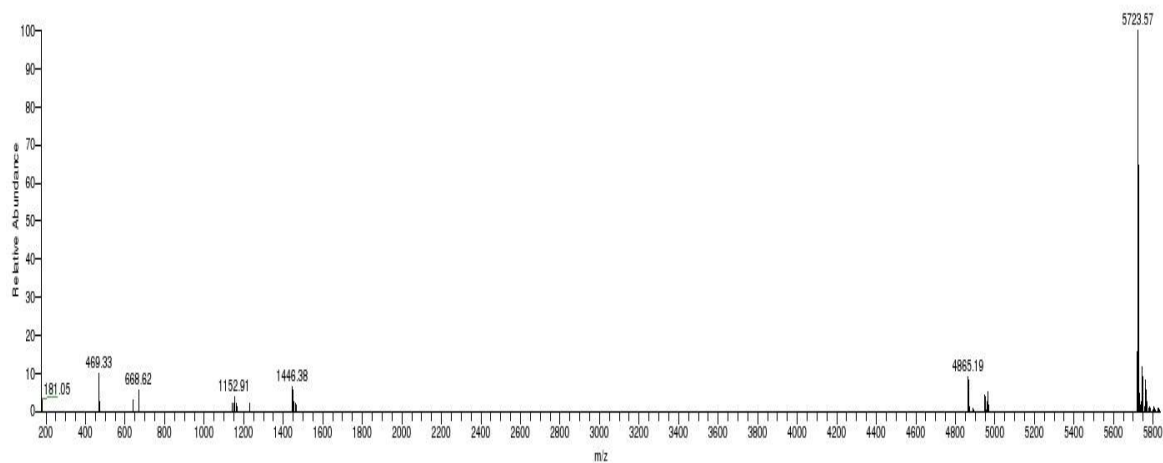


Obrázek 20. Hmotnostní spektrum insulinového analogu **13** (cyklo[G-(D-K_{N3}^{B24})-F-Y-T-P-(D-Prg^{B29})-T]-insulin).

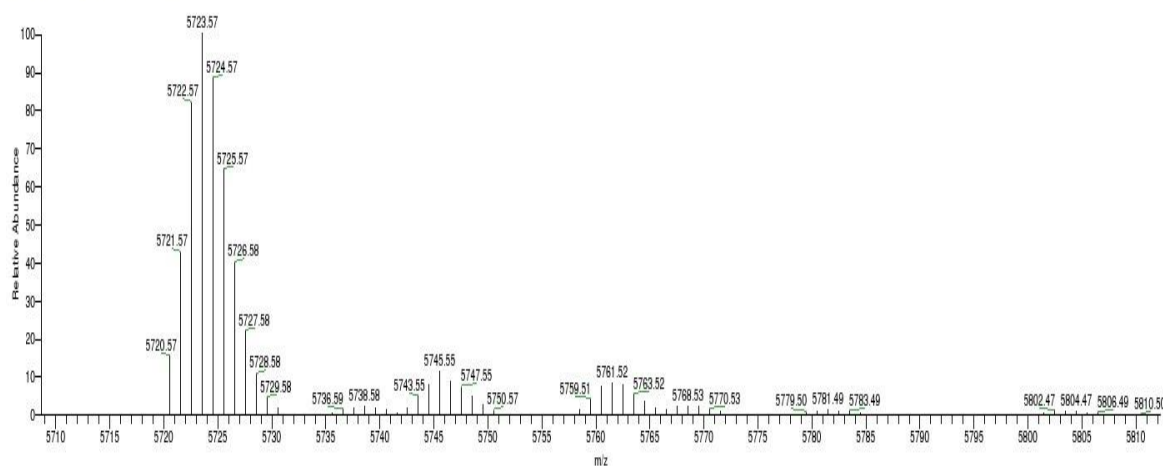
24-0211-2_#51-55 RT: 1.47-1.58 AV: 5 NL: 1.93E6
T: FTMS + p ESI Full ms (150.00-2000.00)



24-0211-2_XT_00001_MHp_110311084610 #1 RT: 1.00 AV: 1 NL: 6.22E5
T: FTMS + p ESI Full ms (150.00-2000.00)



24-0211-2_XT_00001_MHp_110311084610 #1 RT: 1.00 AV: 1 NL: 6.22E5
T: FTMS + p ESI Full ms (150.00-2000.00)



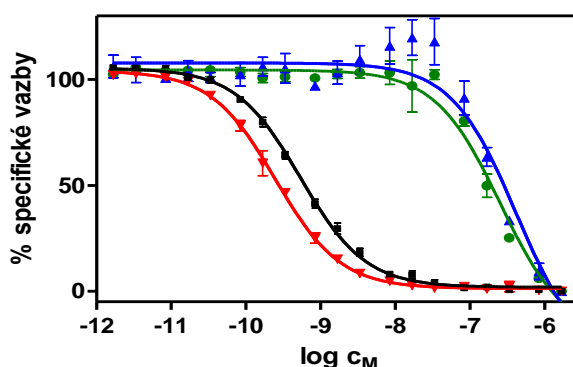
Obrázek 21. Hmotnostní spektrum insulinového analogu **14** (cyklo[G-G-F-Y-(L-Pent^{B27})-P-(L-Pr^{B29})-T]-insulin).

Testování vazebné afinity insulinových analogů *in vitro*

Výsledky testování vazebných afinit lidského insulinu a analogů **12-14** vůči receptoru insulinu v membránách lidských IM-9 lymfocytů jsou uvedeny v Tabulce 4 a vazebné křivky jsou zobrazeny na Obrázku 22. Vazebná afinita lidského insulinu vůči receptoru insulinu byla v souladu s teorií velmi vysoká (K_d okolo 0,37 nM) a byla posuzována jako 100% afinita. Analogy **12** a **13** naproti tomu vykazaly výrazně snížené afinity vůči receptoru a to pouze 0,29% (**12**) a 0,17% (**13**) vazebné afinity lidského insulinu. Překvapením byla velmi vysoká afinita (K_d okolo 0,18 nM) analogu **14**, která více než dvojnásobně překročila afinitu nativního lidského insulinu.

Tabulka 4. Vazebné afinity lidského insulinu a analogů **12-14** vůči receptoru insulinu v membránách lidských IM-9 lymfocytů. Hodnoty disociačních konstant K_d (nM) jsou v pravém sloupci přepočteny na % vzhledem k vazebné afinitě lidského insulinu (100%) podle vzorce: (K_d lidského insulinu / K_d analogu) x 100. n je počet jednotlivých měření (křivek v duplikátech) ze kterých bylo K_d a SEM vypočítány.

insulinový analog, číslo	struktura insulinového analogu	$K_d \pm \text{SEM}$ (nM) (n)	%
lidský insulin	lidský insulin	$0,37 \pm 0,03$ (5)	100
12	cyklo[G-(D-Prg ^{B24})-F-Y-T-P-(D-K _{N3} ^{B29})-T]-insulin	126 ± 16 (3)	0,29
13	cyklo[G-(D-K _{N3} ^{B24})-F-Y-T-P-(D-Prg ^{B29})-T]-insulin	214 ± 50 (3)	0,17
14	cyklo[G-G-F-Y-(L-Pent _{N3} ^{B27})-P-(L-Prg ^{B29})-T]-insulin	$0,18 \pm 0,02$ (4)	206



Obrázek 22. Inhibice vazby lidského [¹²⁵I]-insulinu na receptor insulinu v membránách lidských IM-9 lymfocytů lidským insulinem a analogy **12-14**: (■) lidský insulin, (●) analog **12** (cyklo[G-(D-Prg^{B24})-F-Y-T-P-(D-K_{N3}^{B29})-T]-insulin), (▲) analog **13** (cyklo[G-(D-K_{N3}^{B24})-F-Y-T-P-(D-Prg^{B29})-T]-insulin) a (▼) analog **14** (cyklo[G-G-F-Y-(L-Pent_{N3}^{B27})-P-(L-Prg^{B29})-T]-insulin).

Diskuze

Obsahem této diplomové práce byla příprava tří nových insulinových analogů s kovalentně stabilizovanými cyklickými strukturami v C-konci B-řetězce a zjištění jejich vazebných afinit vůči insulinovému receptoru v membránách lidských IM-9 lymfocytů *in vitro*.

Syntéza látek

Pro vytvoření cyklických struktur v C-koncovém oktapeptidu B-řetězce insulinu jsme využili dnes velmi moderní „click-chemii“, tzn. Huisgenovou azid-alkynovou cykloadici katalyzovanou ionty Cu^{I} za vzniku triazolového kruhu (34). Zvolená strategie zahrnovala nejprve syntézu lineárních oktapeptidů (Obrázek 13), analogů C-koncového oktapeptidu insulinu (pozice B^{23} - B^{30}) metodou syntézy na pevné fázi. Podmínkou cyklizace v případě lineárních peptidů **4** a **5** bylo začlenění příslušných prekursorů pro cykloadici, tzn. D-propargylglycinu (pozice B^{24} či B^{29}) a D- N^{ϵ} -azidolysinu (pozice B^{24} či B^{29}). V případě lineárních oktapeptidů **6** a **7** to byly prekuzory (S)-5-azido-2-pentanová kyselina (pozice B^{27}) a L-propargylglycin (pozice B^{29}).

Manuální syntéza všech čtyř lineárních oktapeptidů proběhla úspěšně, selektivně a s dobrým výtěžkem, který byl po RP-HPLC purifikaci u peptidů **4** a **5** stanoven na 45% a 48% (Tabulka 1). Peptidy **6** a **7** byly cyklizovány v surové formě. Důvod a výsledek budou vysvětleny níže. Použité aminokyseliny N^{α} -Fmoc-propargylglycin v L či D formě, N^{α} -Fmoc-D- N^{ϵ} -azidolysin a N^{α} -(S)-5-azido-2-pentanová kyselina vykazovaly vysokou stabilitu v prostředí reaktivních kondenzačních činidel HBTU a DIC, deprotekčního činidla piperidinu a konečně i TFA použité ke štěpení chránících skupin *t*Bu a byly tak plně kompatibilní s daným metodickým postupem syntézy.

Cyklizace oktapeptidů za vzniku 1,4-substituovaných triazolů byla provedena pomocí zmíněné Huisgenovy azid-alkynové cykloadice katalyzované mědnými ionty. Reakce probíhala rychle (pravděpodobně takřka okamžitě), s vysokým výtěžkem (Tabulka 2) a všechny čtyři cyklické oktapeptidy (Obrázek 14) byly úspěšně připraveny ve své monomerní formě. Vysoká selektivita reakce za vzniku pouze monomerních produktů byla docílena především vhodně zvolenými reakčními podmínkami, které zahrnovali nízkou koncentraci lineárního peptidu (asi 80 μM) a s tím spojený velký objem celkové reakční směsi. Použití 10x vyšší koncentrace při cyklizaci vedlo ke vzniku dimeru v množství asi

50% (výsledky nejsou ukázány). Lineární a cyklické formy oktapeptidů připravených v této práci mají naprosto stejnou relativní molekulovou hmotnost (Tabulky 1 a 2). Důležitou indikací vzniku nové látky proto byla změna retenčního času produktu při RP-HPLC analýze reakční směsi vzhledem k výchozí látce (Obrázek 15). Pro úplnost dodáváme, že identity cyklických oktapeptidů, ze kterých byly již před touto diplomovou prací připraveny insulinové analogy **1-3** (Obrázek 12), byly potvrzeny pomocí ^1H a ^{13}C NMR (není ukázáno).

Pro cyklizaci lineárních oktapeptidů **4** a **5** byly použity jejich RP-HPLC purifikované formy. Pokud vezmeme v úvahu výtěžky syntézy a purifikace lineárních peptidů **4** a **5** (45 a 48%) a dále výtěžky jejich cyklizací a purifikací (61 a 62%) tak dospějeme k celkovému výtěžku asi 28% pro čistý cyklický oktapeptid, kalkulováno počínaje syntézou oktapeptidu lineárního ($100\% \rightarrow 45\% \times 0,62 \rightarrow 28\%$). Protože lineární oktapeptidy **6** a **7** byly v surovém stavu podle analytické RP-HPLC velmi čisté (není ukázáno), rozhodli jsme se ušetřit čas nutný pro jejich purifikaci a cyklizovat je surové. Překvapivé se zdá, že jsme nejen touto metodou ušetřili čas, ale i zlepšili výtěžek, neboť výtěžek cyklizace surových peptidů **6** a **7**, 38 a 40% (Tabulka 2), je znatelně lepší než výsledných 28% v případě purifikovaných lineárních peptidů (viz výše). Důvodem jsou patrně ztráty materiálu při dvojnásobné RP-HPLC purifikaci.

Následnou enzymovou semisyntézou byly připraveny celkem tři insulinové analogy; **12**, **13** a **14** (Obrázek 16). V případě analogu připravovaného z cyklického oktapeptidu **10** nebyla mezi produkty semisyntézy identifikována žádná látka odpovídající svojí relativní molekulovou hmotností danému analogu. Negativní výsledek semisyntetické reakce byl patrně způsoben špatnou rozpustností cyklického oktapeptidu **10** v podmínkách reakce či stericou nepřístupností N-koncové primární aminoskupiny v oktapeptidu pro katalyzující trypsin. Za účelem zlepšení rozpustnosti cyklického oktapeptidu bylo přistoupeno k záměně aminokyseliny fenylalaninu v pozici B²⁴ za glycin (prekurzory **7** a **11**, insulinový analog **14**). Toto opatření se ukázalo jako vhodná volba a semisyntéza tohoto analogu proběhla úspěšně a analog se podařilo izolovat v dostatečném množství. Ovšem i v tomto případě měl cyklický prekurzor **11** tendenci v semisyntetické reakční směsi precipitovat a výtěžek semisyntézy byl výrazně nižší (4%) než u analogů **12** a **13** (25% a 17%, Tabulka 3).

Plánování struktur látek a jejich vazebné afinity

Důvodem přípravy analogů **12** a **13** byl cíl dokončit sérii započatou v laboratoři Dr. J. Jiráčka (analogy **1-3**, Obrázek 12) již před touto diplomovou prací. Tyto látky byly víceméně neaktivní (viz. Úvod). Doufali jsme, že záměnou chiralidy aminokyseliny v obou pozicích B²⁴ a B²⁹ za D-aminokyselinu (D-propargylglycin či D-N^ε-azidolysin) dosáhneme optimální struktury výsledného kruhu a tím i vyšší afinity.

Testováním vazebné afinity analogů **12** a **13** *in vitro* byla zjištěna jejich velmi malá afinita k insulinovému receptoru: 0,29% pro analog **12**, 0,17% pro analog **13** (při afinitě lidského insulinu rovné 100%) (Tabulka 4). Tyto nízké hodnoty ukazují podobný vztah mezi afinitou k insulinovému receptoru a přítomností cyklické struktury mezi aminokyselinami v pozicích B²⁴ a B²⁹ jako u již dříve testovaných analogů **1-3** (0,33% u analogu **1**, 0,13% u analogu **2** a 0,5% u analogu **3**). Cyklizace mezi pozicemi B²⁴ a B²⁹ tedy zřejmě svou výslednou strukturou optimálně nesimuluje předpokládanou aktivní konformaci C-konce B-řetězce insulinu.

Z tohoto důvodu jsme se rozhodli posunout pozici pro cyklizaci z polohy B²⁴ do polohy B²⁷ a zároveň použít jeden z prekurzorů s kratším postranním řetězcem ((S)-5-azido-2-pentanová kyselina) neboť pozice B²⁷ a B²⁹ jsou sobě podstatně blíže než pozice B²⁴ a B²⁹. Posun cyklizace do poloh B²⁷ a B²⁹ byl veden snahou, jak již bylo naznačeno v Úvodu, ponechat důležité aminokyseliny v polohách B²⁴-B²⁶ intaktní a indukovat ohyb jen v pozicích B²⁷-B³⁰. Poloha B²⁷ je navíc obvykle velmi tolerantní k substitucím. Umístění (S)-5-azido-2-pentanové kyseliny do pozice B²⁷ a L-propargylglycinu do polohy B²⁹ a ne naopak, stejně jako výběr pouze jejich L forem, byly vedené intuitivní úvahou na základě našich zkušeností, neboť molekulární modelování a počítačová predikce struktur nejsou v tomto případě možné z důvodu absence znalosti nativní aktivní formy insulinu, tzn. optimálního tvaru ohybu v C-konci B-řetězce. Pro syntézu dalších variant analogu nebyl navíc při řešení této diplomové práce časový prostor.

Komplikací byla neúspěšnost symisyntézy analogu za použití cyklického oktapeptidu **10**. Důvody jsou diskutovány výše. Rozhodli jsme se proto zvýšit rozpustnost oktapeptidu záměnou PheB²⁴ a za GlyB²⁴ (lineární oktapeptid **7** a cyklický **11**). Jak již bylo řečeno v úvodu Gly je v poloze B²⁴ insulinu velmi dobře tolerován. Další výhodou by mohla rovněž být vyšší flexibilita řetězce výsledného insulinu.

K našemu překvapení a radosti byla v případě příslušného insulinového analogu **14** naměřena hodnota vazebné afinity 206% vzhledem k lidskému insulinu (Tabulka 4).

Tento pozitivní výsledek ukazuje, že přítomnost menší cyklické struktury kruhu mezi pozicemi B²⁷ a B²⁹ (oproti kruhu mezi pozicemi B²⁴-B²⁹) stabilizuje C-konec B-řetězce molekuly insulínu do konformace, která by mohla být velice podobná její hypotetické aktivní formě indukované v nativním insulínu při vazbě na receptor. Vyšší afinita analogu vzhledem k nativnímu insulínu může být ovlivněna i tím, že aktivní konformace se u nativního insulínu indukuje až během vazby na receptor zatímco u analogu **14** je přítomná a stabilní již předtím. Není vyloučené, že k vyšší afinitě analogu **14**, kromě samotné stabilizace C-konce B-řetězce mezi pozicemi B²⁷ a B²⁹, také přispívá záměna aminokyseliny fenylalaninu v pozici B²⁴ za glycin. Ta by mohla v důsledku menšího prostorového objemu glycinu oproti fenylalaninu zvýšit volnost a mobilitu C-konce B-řetězce a usnadnit tak vytvoření vhodnější strukturní konformace molekuly analogu pro jeho vazbu s receptorem.

Detailní objasnění nově vzniklých strukturních změn v molekule aktivního analogu **14** ukáže v blízké době krystalografická studie realizovaná ve spolupráci s laboratoří Dr. A. M. Brzozowského (University of York, Velká Británie). Ta by měla přinést podrobné informace o změně prostorové orientace C-koncové části B-řetězce aktivního analogu **14**, jakožto i o dalších možných konformačních změnách v molekule tohoto analogu oproti nativní formě insulínu. Tato data by se pak mohla stát důležitým vodítkem pro vývoj a syntézu dalších aktivních a potenciálně klinicky využitelných insulinových analogů.

Závěr

V této práci se podařilo úspěšně připravit tři nové unikátní analogy insulínu. Podle našich vědomostí jsou to první příklady syntézy nativního proteinu s triazolovým můstkem. Jeden z analogů navíc vykazuje vysokou afinitu vůči receptoru insulínu. Objasnění jeho krystalické struktury by mohlo vést k novým cenným informacím o aktivní konformaci insulínu a vést k vývoji nových terapeuticky slibných molekul.

Seznam použité literatury

1. Steiner, D. F., J. Biol. Chem. 286, 17399-17421 (2011)
2. Zakova, L. and Jiracek, J., Chem. Listy 99, 772-781 (2005)
3. McKern, N. M., Lawrence, M. C., Streltsov, V. A., Lou, M. Z., Adams, T. E., Lovrecz, G. O., Elleman, T. C., Richards, K. M., Bentley, J. D., Pilling, P. A., Hoyne, P. A., Cartledge, K. A., Pham, T. M., Lewis, J. L., Sankovich, S. E., Stoichevska, V., Da Silva, E., Robinson, C. P., Frenkel, M. J., Sparrow, L. G., Fernley, R. T., Epa, V. C., Ward, C. W., Nature 443, 218-221 (2006)
4. Jiracek, J., Zakova, L., Antolíková, E., Watson, C. J., Turkenburg, J. P., Dodson, G. G., Brzozowski, A. M., P. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107, 1966-1970 (2010)
5. Voet, D. and Voet, J., Biochemistry, Wiley, USA (2004)
6. Gavin, J. R., Alberti, K. G. M. M., Davidson, M. B., DeFronzo, R. A., Drash, A., Gabbe, S. G., Genuth, S., Harris, M. I., Kahn, R., Keen, H., Knowler, W. C., Lebovitz, H., Maclaren, N. K., Palmer, J. P., Raskin, P., Rizza, R. A., Stern, M. P., Dia. Care 20, 1183-1197 (1997)
7. Steck, A. K., Winter, W. E., Cur. Op. End. Dia. & Obe. 18, 252-258 (2011)
8. Boinpally, T. Jovanovic, L., M. S. J. Med. 76, 269-280 (2009)
9. <http://www.diabetesexplained.com/secondary-diabetes-and-the-causes.html> (20.7. 2011)
10. Klener, P. Vnitřní lékařství, 3 Ed., Galén, Praha (2006)
11. Skrha, J. Diabetologie, Galén, Praha (2009)
12. Pelikanova, T., Dryakova, M., Koznarova, R. Léčba insulinem. In Bartos, V. and Pelikanova, T. Praktická diabetologie, Maxdorf (2003)
13. Bolli, G. B., Di Marchi, R. D., Park, G. D., Pramming, S., Koivisto, V. A. Diabetologia 42, 1151-1167 (1999)
14. Mayer, J. P., Zhang, F., DiMarchi, R. D. Bipolymers (Pept. Sci.) 88, 687-713 (2007)
15. Mooradian, A. D., Bernbaum, M., Albert, S. G. Ann. Int. Med. 145, 125-134 (2006)

16. Shoelson, S. E., Lu, Z. X., Parlaudan, L., Lynch, C. S., Weiss, M. A. *Biochemistry* 31, 1757-1767 (1992)
17. Howey, D. C., Bowsher, R. R., Brunelle, R. L., Woodworth, J. R. *Diabetes* 43, 396-402 (1994)
18. Setter, S. M., Corbett, C. F., Campbell, R. K., and White, J. R. *Ann. Pharm.* 34, 1423-1431 (2000)
19. Rave, K., Klein, O., Frick, A. D., Becker, R. H. A. *Dia. Care* 29, 1812-1817 (2006)
20. Rosenstock, J., Schwartz, S. L., Clark, C. M., Park, G. D., Donley, D. W., Edwards, M. B. *Dia. Care* 24, 631-636 (2001)
21. Plank, J., Bodenlenz, M. R., Sinner, F., Magnes, C., Gorzer, E., Regittnig, W., Endahl, L. A., Draeger, E., Zdravkovic, M., Pieber, T. R. *Dia. Care* 28, 1107-1112 (2005)
22. Pullen, R. A., Lindsay, D. G., Wood, S. P., Tickle, I. J., Blundell, T. L., Wollmer, A., Krail, G., Brandenburg, D., Zahn, H., Gliemann, J., Gammeltoft, S. *Nature* 259, 369-373 (1976)
23. Young, J. D., Carpenter, F. H. J. *Biol. Chem.* 236, 743-748 (1961)
24. Zoete, V., Meuwly, M., Karplus, M. J. *Mol. Biol.* 342, 913-929 (2004)
25. Gattner, H. G., Danho, W., Behn, C., Zahn, H. Hoppe-Seylers. *Z. Physiol. Chem.* 361, 1135-1138 (1980)
26. Mirmira, R. G. Tager, H. S. J. *Biol. Chem.* 264, 6349-6354 (1989)
27. Hua, Q. X., Shoelson, S. E., Weiss, M. A. *Biochemistry* 31, 11940-11951 (1992)
28. Nakagawa, S. H. Tager, H. S. J. *Biol. Chem.* 262, 12054-12058 (1987)
29. Tager, H., Thomas, N., Assoian, R., Rubenstein, A., Saekow, M., Olefsky, J., Kaiser, E. T. P. *Natl. Acad. Sci. U. S. A* 77, 3181-3185 (1980)
30. Nakagawa, S. H. Tager, H. S. J. *Biol. Chem.* 261, 7332-7341 (1986)
31. Xu, B., Hu, S. Q., Chu, Y. C., Huang, K., Nakagawa, S. H., Whittaker, J., Katsoyannis, P. G., Weiss, M. A. *Biochemistry* 43, 8356-8372 (2004)
32. Zakova, L., Barth, T., Jiracek, J., Barthova, J., Zorad, S. *Biochemistry* 43, 2323-2331 (2004)

33. Zakova, L., Kazdova, L., Hanclova, I., Protivinska, E., Sanda, M., Budesinsky, M., Jiracek, J. *Biochemistry* 47, 5858-5868 (2008)
34. Meldal, M. Torgersen, C. W. *Chem. Rev.* 108, 2952-3015 (2008)
35. Mirmira, R. G. Tager, H. S. *Biochemistry* 30, 8222-8229 (1991)
36. Kristensen, C., Kjeldsen, T., Wiberg, F. C., Schaffer, L., Hach, M., Havelund, S., Bass, J., Steiner, D. F., Andersen, A. S. *J. Biol. Chem.* 272, 12978-12983 (1997)
37. Ciszak, E., Beals, J. M., Frank, B. H., Baker, J. C., Carter, N. D., Smith, G. D. *Structure* 3, 615-622 (1995)
38. Fields, G. B., Noble, R. L. *Int. J. Pept. Prot. Res.* 35, 161-214 (1990)
39. Barlos, K., Chatzi, O., Gatos, D., Stavropoulos, G. *Int. J. Pept. Prot. Res.* 37, 513-520 (1991)
40. Kaiser, E., Colescott, R.L., Bossinger, C.D., Cook, P. I. *Anal. Biochemistry* 34, 595-& (1970)
41. Isaad, A. L., Papini, A. M., Chorev, M., Rovero, P. J. *Pept. Sci.* 15, 451-454 (2009)
42. Svoboda, I., Brandenburg, D., Barth, T., Gattner, H. G., Jiracek, J., Velek, J., Blaha, I., Ubik, K., Kasicka, V., Pospisek, J. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 375, 373-378 (1994)
43. Svoboda, I. *Chem. listy* 85, 1105-1118 (1991)
44. Zakova, L., Zyka, D., Jezek, J., Hanclova, I., Sanda, M., Brzozowski, A. M., Jiracek, J. *J. Pept. Sci.* 13, 334-341 (2007)
45. De Meyts, P. *Methods in Receptor Research*, M.Dekker, New York (1976)

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka
-------------------------------	----------	-----------------	----------